

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ЦЕНТР ЭКСТРЕННОЙ И РАДИАЦИОННОЙ  
МЕДИЦИНЫ ИМЕНИ А.М. НИКИФОРОВА» МЧС РОССИИ

*На правах рукописи*

**ЖИРКОВ**

**Антон Анатольевич**

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО  
СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И  
КРОВИ ПРИ МЕНИНГИТАХ У ДЕТЕЙ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика  
(биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Доктор биологических наук  
Алексеева Лидия Аркадьевна

Санкт-Петербург – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |     |
|--|-----|
| <b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....  | 3   |
| <b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....   | 10  |
| 1.1. Современные представления о патогенезе менингита .....  | 10  |
| 1.2. Разнообразие фенотипов лимфоцитов и их функциональные характеристики .....  | 23  |
| 1.3. Современные способы клинико-лабораторной диагностики менингитов .....   | 30  |
| <b>Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....   | 39  |
| <b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....  | 46  |
| 3.1. Клинико-лабораторная характеристика детей с менингитом .....  | 46  |
| 3.2. Субпопуляционный состав лимфоцитов ликвора у детей группы сравнения .....   | 54  |
| 3.3. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора при менингитах у детей .....                                   | 58  |
| 3.3.1. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора при вирусном серозном менингите у детей .....                | 58  |
| 3.3.2. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора при бактериальном гнойном менингите у детей .....            | 61  |
| 3.4. Соотношение субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора и крови при менингитах .....                             | 68  |
| 3.5. Дифференциально-диагностическая значимость показателей субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора ..... | 72  |
| <b>ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....  | 83  |
| <b>ВЫВОДЫ</b> .....  | 94  |
| <b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b> .....   | 96  |
| <b>ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ</b> .....  | 96  |
| <b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....   | 97  |
| <b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....  | 99  |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ А</b> .....  | 119 |

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Инфекционные заболевания центральной нервной системы (ЦНС) остаются серьёзной проблемой в связи с тяжестью течения, высоким риском летальных исходов, возможностью формирования неврологического дефицита в резидуальном периоде, а также низкой верификацией возбудителя [9,15,17,18,22]. В современной литературе обсуждается необходимость расширения критериев диагностики заболеваний ЦНС путем более детальной оценки биохимического и клеточного состава ликвора (или цереброспинальной жидкости (ЦСЖ)) [3,5,6,7,8,34,81,92].

Проникающие в организм инфекционные агенты запускают каскад механизмов врождённого и адаптивного иммунного ответа, приводящий к нарушению проницаемости гематоэнцефалического/гематоликворного барьеров (ГЭБ/ГЛБ) и развитию воспаления нервной ткани, ключевым моментом которого является инфильтрация иммунокомпетентных клеток из системного кровотока в ЦНС [11,104]. В развитии адаптивного иммунного ответа центральную роль играют лимфоциты и антигенпрезентирующие клетки. Применение проточной цитометрии позволяет более детально изучить клеточный состав ЦСЖ и расширить спектр изучаемых субпопуляций лимфоцитов. В настоящий момент по наличию кластеров дифференцировки (CD) выделяют 3 основные субпопуляции: общие Т-лимфоциты с фракциями Т-хелперов (Th) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), натуральные киллеры (NK) и В-лимфоциты [26]. Помимо основных популяций дифференцируют множество малых субпопуляций (NKT (Natural Killer T-cells), DN (Double Negative T-cells), DP (Double Positive T-cells),  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$ ,  $CD3^-CD8^+NK$ ), обладающих собственными регуляторными и эффекторными характеристиками [27]. В частности, показано, что NKT модулируют активность клеток адаптивного иммунного ответа (Т- и В-лимфоцитов) за счёт специфической продукции цитокинов [2]. DN участвуют в супрессии антиген-специфического Т-клеточного ответа, за

счёт продукции IL-10 [47]. DP и CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK проявляют цитотоксическую активность за счёт выделения гранул с цитолитическими ферментами [42].

В современной литературе имеются немногочисленные данные об изменениях субпопуляционного состава лимфоцитов (ССЛ) крови и ликвора при менингитах [6,8,92,110]. В ранних работах исследованы только Т- и В-лимфоциты крови и ЦСЖ [143,153,156]. В ряде исследований изучались все основные субпопуляции крови и ЦСЖ, включая NK [6,81,105,110]. В большинстве публикаций исследования субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора проводились только в остром периоде вирусного или бактериального менингита [6,92,110]. При этом основная масса работ выполнена преимущественно на когорте взрослых пациентов [6,92,110], тогда как у детей данные о ССЛ ЦСЖ при менингитах немногочисленны и фрагментарны [81,129,143]. Практически отсутствуют сопоставления ССЛ с особенностями клинического течения и исхода менингита [70]. Лишь в нескольких публикациях указывается на диагностические и прогностические возможности исследования показателей реакций врождённого и адаптивного иммунитета, включая некоторые субпопуляции лимфоцитов крови и ЦСЖ у взрослых пациентов с бактериальным гнойным менингитом (БГМ) [7,14]. Таким образом, анализ современных литературных данных указывает на недостаточную изученность динамики основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ЦСЖ и диагностическую значимость их определения при менингитах у детей. Не охарактеризован субпопуляционный состав лимфоцитов ликвора у детей различного возраста без воспаления оболочек и ткани мозга («норма»), отсутствуют сведения о ССЛ крови и ликвора при менингитах различной этиологии и тяжести течения, что обуславливает актуальность цели и задач настоящего исследования.

**Степень разработанности темы исследования.** Исследования пула лимфоцитов крови и ликвора при менингитах с помощью проточной цитометрии начались в странах северной Европы (Германия, Швеция) и Азии (Япония) на ранних этапах внедрения метода в биомедицинские

исследования [141,142,153]. Однако, несмотря на теоретическую и практическую значимость, данные литературы, касающиеся этой проблемы, остаются фрагментарны и противоречивы [92,110], а для детей подобные исследования на сегодняшний день практически отсутствуют [81].

В последнее десятилетие в мире наблюдается подъём интереса к исследованию субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора в целях исследования патогенеза различных заболеваний ЦНС и диагностической значимости его определения [70,72,76,77]. Однако работ, посвященных сопоставлению ССЛ при менингитах бактериальной и вирусной природы в доступной литературе не найдено, что не позволяет охарактеризовать особенности интраккального и системного иммунного ответа, выявить роль субпопуляций лимфоцитов в патогенезе вирусного серозного и бактериального гнойного менингита. Предпринимаются попытки связать субпопуляционный состав лимфоцитов с этиологией, тяжестью течения и исходами бактериального гнойного менингита у взрослых пациентов, в частности, установлена связь абсолютного количества НКТ клеток с крайне тяжёлым течением пневмококкового менингита [6,7,14]. В научной литературе отмечается неспецифичность клинических проявлений менингитов вирусной и бактериальной этиологии, низкая эффективность методов верификации, стандартных лабораторных показателей крови и ликвора [18,30]. Практически не изучена связь субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора с тяжестью течения и исходом менингитов у детей, общепринятыми ликворологическими лабораторными показателями, этиологией, что, в совокупности, не позволяет определить его диагностическое значение.

**Цель исследования:**

определить диагностическое значение субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора при вирусных и бактериальных менингитах у детей.

### **Задачи исследования:**

1. Провести сравнительную оценку диагностической эффективности стандартных клинико-лабораторных показателей у детей с вирусным серозным и бактериальным гнойным менингитом.
2. Оптимизировать метод проточной цитометрии для исследования состава лимфоцитов ликвора с выявлением его особенностей у детей группы сравнения разного возраста.
3. Охарактеризовать в динамике субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора при вирусном серозном и бактериальном гнойном менингите у детей в зависимости от стадии заболевания, этиологии и степени тяжести.
4. Выявить особенности соотношения субпопуляций лимфоцитов ликвора и крови в группе сравнения и при менингитах у детей.
5. Разработать способ дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных менингитов на основе исследования субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора.

**Научная новизна исследования.** Впервые охарактеризован субпопуляционный состав лимфоцитов ликвора у детей группы сравнения (ОРВИ с менингизмом) и установлена его зависимость от возраста.

Впервые при бактериальных гнойных и вирусных серозных менингитах выявлены характерные изменения в составе основных и малых субпопуляций крови и ликвора на разных стадиях заболевания, установлены достоверные различия в зависимости от этиологии и степени тяжести, что может быть использовано с целью дифференциальной диагностики, контроля за течением заболевания и эффективностью терапии.

Впервые проведён расчёт соотношения лимфоцитов ликвора и крови в группе сравнения и у детей с менингитами на разных стадиях заболевания и установлены субпопуляции, изменения которых характерны для интратекального и системного адаптивного иммунного ответа при вирусных серозных и бактериальных гнойных менингитах у детей.

Разработан способ дифференциальной диагностики вирусного и бактериального менингита, основанный на определении В-лимфоцитов в ликворе, обладающий высокой чувствительностью (100%) и специфичностью (97,7%).

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Результаты исследования дополняют и обобщают современное представление о патогенезе вирусного серозного и бактериального гнойного менингита. Доказано участие основных (Т-лимфоциты, включая Th и CTL, NK, В-лимфоциты) и малых субпопуляций лимфоцитов (DN, DP, NKT,  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$ ,  $CD3^-CD8^+NK$ ) крови и ликвора в пато- и саногенезе вирусного серозного и бактериального гнойного менингита, а также их связь со степенью тяжести БГМ. Доказано, что показатели субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора являются характерными маркерами вирусного и бактериального менингита и могут быть использованы для эффективной дифференциальной диагностики менингитов вирусной и бактериальной природы.

Оптимизирован метод проточной цитометрии для исследования малоклеточных популяций лимфоцитов ликвора для диагностики бактериальных и вирусных менингитов.

Разработанный способ дифференциальной диагностики вирусного и бактериального менингита способствует своевременной диагностике менингитов и позволяет корректировать этиотропную терапию.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой диссертации является систематизированное применение экспериментальных и теоретических методов научного познания с целью решения поставленных задач. Работа выполнена в дизайне сравнительного открытого исследования с использованием лабораторных, клинических и статистических методов с разрешения локального этического комитета: протокол № 93 от 07.11.17.

## **Положения, выносимые на защиту диссертации**

1. Широкая область совпадения стандартных лабораторных показателей крови и ликвора (общие лейкоциты и С-реактивный белок крови, общий белок и цитоз ликвора) у детей с вирусным серозным и бактериальным гнойным менингитом не позволяет их использование с целью дифференциальной диагностики.

2. Выявленные характерные особенности субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора при менингитах у детей зависят от природы (вирусной или бактериальной), стадии и тяжести заболевания и характеризуют интратекальный и системный клеточный иммунный ответ.

3. Разработанный способ дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных менингитов, основанный на определении количества В-лимфоцитов в ликворе методом проточной цитометрии, обладает высокой чувствительностью (100%) и специфичностью (97,7%), что позволяет на ранней стадии заболевания проводить коррекцию этиотропной терапии.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования.**

Степень достоверности результатов определяется обследованием достаточного количества детей (n=152, общее число исследований - 374), применением современных высокоразрешающих лабораторных методов (проточная цитофлуорометрия) и адекватной статистической обработкой полученных результатов (пакет прикладных программ Microsoft Office Excel 2013, FlowJo 2010 и GraphPad Prism 5.0 для Windows).

Основные результаты работы доложены и обсуждены на XXXVII, XXXIX, XXXXI, XXXXIII итоговых научно-практических конференциях в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России «Актуальные вопросы инфекционных заболеваний у детей» (СПб, 2016, 2017, 2019, 2021), XX Давиденковских чтениях – 2018 (СПб.), XIX конгрессе детских инфекционистов России: «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики» - 2020 (Москва).



### **Внедрение результатов научных исследований в практику.**

Результаты исследования внедрены в практику работы и используются в ряде учреждений - БУЗ УР «Республиканская клиническая инфекционная больница» (г. Ижевск), ОБУЗ «Шуйская центральная районная больница» (г. Шуя Ивановской области), ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (г. Москва), ГБУЗ «АОДКБ» (г. Архангельск).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК по специальности «клиническая лабораторная диагностика», 8 – в материалах научно-практических конференций, получен патент на изобретение №2695359 «Способ дифференциальной диагностики менингитов у детей» - 2019.

### **Личный вклад автора в проведенные исследования.**

Автором сформулированы цель и задачи исследования, разработан дизайн и методология исследования, проведён анализ биологического материала пациентов, выполнена статистическая обработка, интерпретация и обобщение результатов исследования, а также представление научных данных.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, главы результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейших исследований, списка литературы. Работа иллюстрирована 19 таблицами (включая 4 таблицы приложения А) и 13 рисунками. Список литературы включает 172 источника: отечественных – 32 и иностранных авторов – 140.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Современные представления о патогенезе менингита

Инфекционные заболевания, протекающие с поражением ЦНС, остаются одной из актуальных проблем современной медицины. Менингит – полиэтиологическое заболевание, характеризующееся воспалением мягких оболочек головного и спинного мозга в ответ на инвазию патогенных микроорганизмов и сопровождающееся общеинфекционными, общемозговыми, менингеальными симптомами и воспалительными изменениями цереброспинальной жидкости. Согласно данным современных литературных источников патогенез менингита можно представить в виде многоступенчатого процесса, сопровождающегося запуском и реализацией параллельно как патогенных свойств возбудителя (бактерии, вирусы и др.), так и защитных механизмов макроорганизма [11,53,104]. Ключевыми событиями заболевания являются: колонизация слизистых оболочек патогенными микроорганизмами; проникновение и выживание патогенов в кровеносной системе, активация врождённого и адаптивного иммунитета; преодоление патогенными микроорганизмами барьеров мозга; развитие нейровоспаления [11,104,157].

Возбудителями бактериальных гнойных менингитов в 90% случаев становятся *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza* и *Streptococcus pneumoniae* [16]. В этиологической структуре вирусных менингитов наибольшее значение имеют вирусы, относящиеся к роду *Enterovirus* (ЭВ) [19]. Для каждого возбудителя характерны специфические факторы патогенности, обеспечивающие их адгезию, инвазию, колонизацию, токсический эффект, а также нарушение иммунного ответа макроорганизма.

Бактерии и вирусы выработали различные механизмы, позволяющие уклониться от иммунного ответа, тем самым реализуя свои патогенные свойства на уровне слизистых оболочек, в кровеносном русле и в случае менингита на уровне оболочек мозга. Так, одной из стратегий уклонения ЭВ от иммунного ответа является синтез протеаз, позволяющих вирусу

блокировать и модулировать активность заражённых клеток [84,158]. Бактерии в своём арсенале применяют множество экстра- и внутриклеточных механизмов уклонения от иммунного ответа: выделяют IgA – протеазы, прикрепляются к ингибирующим рецепторам фагоцитов для подавления респираторного взрыва, могут выходить из фагосомы и ингибировать их созревание, удалять активные токсичные радикалы кислорода и многое другое [21].

В патогенезе инфекционных заболеваний более значимым фактором, чем патогенные свойства возбудителя, является состояние иммунитета. Дисфункции противоинфекционной защиты приводит к успешной колонизации слизистых оболочек, проникновению и распространению инфекционных агентов в кровеносной системе. Инвазия патогена сопровождается активацией врождённых и адаптивных механизмов иммунной защиты организма. Важную роль в формировании иммунных реакций играют лимфоциты – гетерогенная популяция лейкоцитов, образующихся в костном мозге. Исследования последних лет показывают важнейшую роль лимфоцитов в течении и исходе инфекционных заболеваний, включая менингит. Так, показано что субпопуляционный состав лимфоцитов может отражать тяжесть течения бактериального менингита и влиять на характер проводимой терапии [6].

Начальным звеном защиты против инфекции являются реакции гуморальных и клеточных компонентов врождённого иммунитета, которые развиваются в течение первых секунд, минут и часов. Ключевыми событиями врождённого иммунитета являются: опосредованная рецепторами активация клеток (эпителий, макрофаги, дендритные клетки, микроглия), фагоцитоз возбудителя (нейтрофилы, моноциты/макрофаги, дендритные клетки), активация системы комплемента. Среди лимфоцитов за реакции врождённого иммунитета отвечают NK (Natural Killer) и NKT (Natural Killer T-cells), которые обеспечивают связь между врождённым и адаптивным иммунным ответом [66].

Полноценный адаптивный иммунный ответ формируется спустя 5-7 дней после заражения, так как требует пролиферации и дифференцировки клеток. В адаптивном иммунном ответе центральную роль играют Т- и В-лимфоциты. Основными процессами адаптивного иммунного ответа является клональная селекция, клональная экспансия и специфический иммунный ответ. Нарушение механизмов врождённого и адаптивного иммунитета приводит к успешной реализации возбудителями своих патогенных свойств. Так, при пневмококковой инфекции, которая способна вызывать менингит, дисфункция В-лимфоцитов, дефицит компонентов комплемента и дисфункция паттерн-распознающих рецепторов (Pattern Recognition Receptors (PRR)) системы врождённого иммунитета могут быть причиной тяжёлого и рецидивирующего течения заболевания [24]. Среди факторов, способствующих инвазии патогенов, рассматривают ранее перенесённые заболевания, а также генетические факторы, которые могут определять восприимчивость макроорганизма инфекциям [35,164].

Местом проникновения большинства возбудителей в организм человека являются слизистые поверхности органов дыхания. В настоящий момент активно развивается концепция барьерных функций лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми (mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)). Эти структуры, состоящие из диффузно распределённой сети клеток эпителиального и иммунного происхождения, являются регуляторами противoinфекционного ответа слизистых оболочек носа и верхних дыхательных путей. Лимфоидная ткань назофарингеальной полости представлена зонами обогащёнными Т- и В-лимфоцитами, дендритными клетками, макрофагами, микроскладчатыми клетками (М-клетки) и др. [144]. Соотношение Т- и В-клеток примерно одинаковое. Популяция Т-лимфоцитов содержит в 3-4 раза больше  $CD4^+$  Т-клеток, чем  $CD8^+$  Т-клеток.  $CD4^+$  Т-клетки находятся в «наивном» состоянии, тогда как цитотоксические Т-лимфоциты представлены различными фенотипами, включая клетки памяти. В-лимфоциты в слизистых оболочках представлены «наивными» В-

лимфоцитами, но также встречаются плазматические клетки и В-клетки памяти [88].

Показаны изменения во врождённом и адаптивном мукозальном иммунном ответе после экспериментального назального заражения пневмококками здоровых взрослых волонтеров без естественного носительства пневмококка. В частности, у колонизированных пневмококком, в отличие от не колонизированных испытуемых, наблюдалось сокращение кластеров В-клеток и  $CD161^+CD8^+$  Т-лимфоцитов (цитотоксические Т-клетки памяти). В динамике экспериментального инфицирования пневмококком наблюдается сокращение В-клеточной популяции в слизистой оболочке носа, также предположительно вследствие их миграции в кровь [85]. Среди малых субпопуляций лимфоцитов в экспериментальных работах показано, что НКТ способны индуцировать защитный иммунитет носоглотки, вовлекая в иммунные реакции дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты [154]. Изменения в составе иммунных клеток слизистой оболочки носа происходят в течение всей жизни, а дисфункция мукозального иммунитета может коррелировать с тяжестью течения инфекционных заболеваний [162].

Иммунная системам слизистых и системный иммунитет имеют различные функциональные структуры и могут активироваться и регулироваться независимым образом [135]. Вслед за успешной колонизацией слизистых, инвазивные формы возбудителя проникают в подлежащие ткани организма человека. Внедрение возбудителя вызывает прямую, вследствие заражения клеток, и опосредованную цитокинами активацию эндотелия сосудов [62]. Стадия вирусемии и бактериемии в кровеносной системе сопровождается активацией системного врождённого и раннего адаптивного иммунного ответа. В крови инфекционный агент взаимодействует с гуморальными факторами иммунитета: компоненты комплемента и иммуноглобулины. Происходит активация системы комплемента [95], центральную роль в которой играет С3 компонент комплемента [125]. Опсонизация возбудителя облегчает фагоцитоз и его

последующее уничтожение гидролитическими ферментами в лизосомах фагоцитов. При этом возбудитель может непосредственно активировать нейтрофилы, дендритные клетки и моноциты/макрофаги через систему PRR, из которых наиболее изученными являются система Toll-подобных рецепторов (TLR). Система TLR активируется в ответ на обширные классы соединений, не свойственных для многоклеточных организмов и способна «настроить» врождённый иммунитет на различные бактериальные (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5) и вирусные (TLR3, TLR7, TLR9) антигены [71]. Все TLR активируют экспрессию генов цитокинов и хемокинов по классическому MyD88-зависимому пути сигнализации, активируя нуклеарный фактор карра В (NF- $\kappa$ B) и активаторный белок 1 (AP1) [130]. Активированные профессиональные фагоциты, лимфоциты врождённого иммунитета, а также заражённые клетки эндотелия сосудов экспрессируют цитокины, тем самым являясь важными модуляторами воспалительного процесса, так и дальнейшего иммунного ответа [33,102]. Экспрессия эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов и хемокинов активирует гранулоцитопоз, поляризацию некоторых лимфоидных субпопуляций (Th), миграцию иммунных клеток к участку повреждённой или заражённой ткани, а также индукцию ими синтеза цитокинов [106].

Среди клеток лимфоидного ряда свойствами врождённого иммунитета обладают НК, несущие на своей поверхности уникальную системой PRR обеспечивающую иммунный ответ на заражение клеток внутриклеточными вирусами и некоторыми видами бактерий. Активированные возбудителем НК вырабатывают TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , стимулируя тем самым адаптивный иммунитет. В отличие от профессиональных фагоцитов НК уничтожают заражённые клетки с помощью гранул, содержащих цитотоксические и цитолитические белки, такие как перфорины и гранзимы [33]. В последнее время появляются сообщения, что НК могут обладать некоторыми свойствами характерными для Т- и В-лимфоцитов. НК развивают аналог иммунологической памяти, формируя более быстрый противои инфекционный

ответ, а также способны к быстрой экспансии и сокращению численности [126]. Важным звеном системного врождённого иммунного ответа, выступают НКТ, которые с помощью Т-клеточного рецептора (CD1d) прямо распознают специфические структуры на поверхности ряда бактерий [2]. НКТ также могут активироваться под воздействием цитокинов, секретлируемых дендритными клетками, которые первыми реагируют на возбудитель посредством TLR. Это не прямое узнавание позволяет НКТ реагировать на широкий спектр возбудителей инфекций [152]. НКТ участвуют в иммунном ответе, взаимодействуя с другими клетками врождённого и адаптивного иммунитета в процессе его регуляции [131,134,147].

Генерализация инфекции активирует ранний системный адаптивный иммунитет. Созревание Т- и В-лимфоцитов происходит в центральных (тимусе, костный мозг), а специализация в периферических отделах лимфатической системы (периферических лимфатических узлах, селезёнке, лимфоидной ткани слизистых и мозговых оболочках) [98].

В случае, если ранее организм встречался с возбудителем, шансы на успешную быструю элиминацию патогена возрастают за счёт специфических антител (IgA на слизистых оболочках, IgG в крови) и антиген-специфических клеток адаптивного иммунитета [124]. В случае, если возбудитель уклонился от первичных реакций врождённого иммунитета, происходит его диссеминация в кровеносной, лимфатической системе и периферической нервной системе. Нейротропность возбудителей менингита позволяет им различными путями распространяться на центральную нервную систему.

Гомеостаз ЦНС поддерживают физиологические барьеры, которые контролируют проникновение биологически активных молекул, растворённых веществ и иммунокомпетентных клеток [50,56]. Основными воротами для проникновения в ЦНС возбудителей и иммунных клеток является сосуда лептоменингеальной оболочки (мягкая мозговая оболочка и паутинное сплетение), менингеальные сосуды твёрдой мозговой оболочки и

сосудистое сплетение (Choroid plexus) – анатомические структуры, в которых расположен гематоликворный барьер (ГЛБ). Сосудистое сплетение пронизано сетью капилляров и обеспечивает барьерные функции, поддерживая гомеостаз ЦНС [67]. Основными морфологическими структурами ГЛБ являются: фенистрированный эндотелий капилляров (проницаемый для медиаторов воспаления), строма, населённая стромальными иммунными клетками и кубический эпителий, выстилка внутренней поверхности желудочков с плотными контактами (tight junctions) [136]. В отличие от ГЛБ гематоэнцефалический и ликвороэнцефалический барьеры имеют ряд анатомических отличий. Так, основной единицей ГЭБ является «нейроваскулярный юнит» (neurovascular unit), состоящий из эндотелиоцитов, астроцитов, нейронов, перицитов и микроглии на периферии [10]. По современным представлениям все эти клеточные слои барьеров служат своего рода интерфейсами (связующим звеном) между кровью и мозгом и призваны максимально затруднить проникновение возбудителя, а при необходимости быстро организовать противоинфекционный иммунный ответ.

По данным современной литературы, мозговые оболочки ЦНС, содержат богатый репертуар иммунных клеток, включая клетки адаптивного иммунитета, обеспечивающие иммунологическую защиту головного и спинного мозга [46]. Например, было показано, что мозговые оболочки в дуральных венозных синусах содержат плазматические клетки, секретирующие IgA [61]. С возрастом, вследствие нарушения развития, в ответ на инфекцию, воспаление или рак в оболочках спинного и головного мозга формируются третичные лимфоидные структуры из организованных агрегатов Т- и В-лимфоцитов [44].

В условиях физиологической нормы в ЦСЖ содержится незначительное по сравнению с кровью количество лимфоцитов (до 6 кл/мкл) [15]. Их роль в процессах жизнедеятельности мозга остаётся малоизученной. На сегодняшний день существует несколько моделей,



описывающих проникновение иммунных клеток в ЦСЖ здоровых людей: 1) многоступенчатое проникновение через барьеры мозга клеток из кровообращения; 2) из лимфатической системы с током физиологических жидкостей вследствие давления жидкости во время дыхания (через грудинный проток) и в нескольких местах желудочков из кровотока [89].

Распределение субпопуляций лимфоцитов в периферической крови связано с процессами накопления (пролиферация и выход из периферических лимфоидных органов) и сокращения численности (апоптоз и др.) этих субпопуляций. При этом динамическое изменение содержания субпопуляций лимфоцитов в крови и ликворе острого периода инфекционных заболеваний нервной системы связано в основном с активностью миграции клеток из периферической крови и мозговых оболочек, а также с пролиферацией лимфоцитов в ликворе. Клеточный иммунологический контроль инфекционного процесса в крови и ликворе, при заболеваниях с поражением ЦНС, осуществляется за счёт  $CD8^+$  (CTL) клеточно-опосредованной цитотоксичности, В-клеточного гуморального ответа, а также прямой эффекторной активности  $CD4^+$  (Th) клеток (синтез цитокинов, цитотоксичность) [70].

В экспериментальных работах доказана способность Т-лимфоцитов определённых фенотипов ( $CD8^+$  CNS tissue-resident memory T-cells,  $CD4^+CCR^{high}$  effector memory) проникать через ГЭБ/ГЛБ в отсутствие воспаления в процессе непрерывного поиска патогенов и опухолей [78]. Состав иммунокомпетентных клеток в нормальной ЦСЖ уникален, и в основном представлен эффекторными Т-лимфоцитами, эффекторными Т-лимфоцитами памяти и Т-клетками центральной памяти [69], тогда как содержание В-лимфоцитов, НК, а также лимфоидных, миелоидных дендритных клеток и макрофагов невелико, а гранулоциты представлены в незначительном количестве [69,115,142]. Анализ современных литературных источников по морфологии и иммунной активности мозговых оболочек

позволил сформировать концепцию о мозге как о «виртуальном» вторичном лимфоидном органе [113].

К базовым представлениям, основанным на концепции иммунологического контроля ЦНС иммунными клетками кровеносной системы, добавляются новые сведения. Обнаружено, что при нейровоспалении, проникающие в ЦНС миелоидные клетки (моноциты и нейтрофилы) могут происходить из пула на границе мозга (ниши черепа и костного мозга позвоночника) и демонстрировать уникальный транскрипционный профиль, отличающийся от тех, что получены из клеток кровотока [46]. При этом роль третичных лимфоидных структур оболочек мозга, резидентных иммунных клеток ЦНС в процессе нейровоспаления при нейроинфекционных заболеваниях, включая менингит, на сегодняшний день изучена недостаточно.

Только небольшое число видов бактерий способно проникать в менингеальные оболочки. Это свидетельствует о наличии специфических факторов вирулентности, главный из которых капсула, защищающая бактерию от фагоцитоза и комплемент-опосредованного лизиса [45]. На данный момент рассматривают три основных механизма проникновения бактерий в ЦНС: рецептор-опосредованный пиноцитоз (парацеллюлярный), нарушение структуры эндотелия и транзитное заражение с помощью лейкоцитов (hitch-hiking model) [48].

Напротив, достаточно большое количество вирусов способно инфицировать ЦНС, однако, развитие полноценного нейроинфекционного процесса происходит у ограниченного количества индивидуумов. Вирусы, в том числе энтеровирусы (ЭВ), проникают в ЦНС гематогенным путем непосредственно через ГЭБ/ГЛБ используя для этого иммунокомпетентные, эпителиальные и клетки ЦНС [112]. В частности, было показано, что один из доминирующих в настоящий момент серотип ЭВ71, вызывающий серозный менингит, использует для проникновения в клетку специфические рецепторы

[101,116,166]. Существует также не гематогенный путь проникновения в ЦНС в обход барьеров (например, нейрогенный).

Внедрение возбудителя в мозговые барьеры, сопровождается запуском каскада реакций местного врождённого иммунитета с активацией периваскулярных макрофагов, эндотелиоцитов, перицитов, тучных клеток и др. [118]. Первой линией защиты от внедрения возбудителя в ЦНС выступают периваскулярные макрофаги и стромальные клетки. Возбудитель запускает поляризацию макрофагов, которая зависит от типа патогена [103]. Наиболее изученными являются М1-макрофаги, характеризующиеся экспрессией про-воспалительных цитокинов IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, повышенной фагоцитарной активностью и М2-макрофаги, характеризующиеся противовоспалительным действием, экспрессией IL-10, а также участием в репарации тканей [103,168]. Продукция периваскулярными макрофагами IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  активирует экспрессию эндотелиоцитами молекул клеточной адгезии, что в дальнейшем обеспечивает инфильтрацию клеток из окружающих тканей [91].

Локальное воспаление характеризуется экспрессией про-воспалительных цитокинов и хемокинов, запускающих механизмы рекрутирования иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления. В зону формирующегося воспаления через активированный эндотелий, строму и эпителий по хемокиновому и цитокиновому градиенту устремляются лейкоциты периферической крови. Воздействие патогена в совокупности с влиянием цитокинового микроокружения приводят к изменениям адгезивных и структурных свойств ГЭБ/ГЛБ, что облегчает инфильтрацию лейкоцитов через ГЭБ/ГЛБ в ЦСЖ [157].

Воспаление менингеальных оболочек, проникновение возбудителя в субарахноидальное пространство приводит к нейровоспалению и изменению барьерных свойств мозга. Вследствие этого наблюдается плеоцитоз ЦСЖ, как один из основных маркеров нейроинфекции [161]. В зависимости от особенностей природы возбудителя и типа его паразитирования формируется

специфический профиль цитокинов и хемокинов, определяющий характер дальнейшего плеоцитоза (нейтрофильного, моноцитарного или смешанного) и поляризации иммунокомпетентных клеток.

В субарахноидальном пространстве инфекционный агент активирует резидентные иммунные клетки (макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты) и клетки нервной ткани (микроглия, астроциты, нейроны) [68,146]. В последнее время стали появляться работы подтверждающие, что клетки нервной ткани: микроглия, астроциты и нейроны способны экспрессировать TLR [94]. На данный момент ключевым звеном, запускающим реакцию врождённого иммунитета и стимулирующего адаптивный на уровне нервной системы, считается микроглия, которая берёт начало из одной с макрофагами и дендритными клетками клеточной линии [94]. Микроглия способна экспрессировать большинство TLR и рецептор макрофагов CD14, участвующий в распознавании бактериальных антигенов [94,107], что делает её первичным звеном защиты мозга от бактериальных инфекций [82,147]. Фагоцитарная активность и способность экспрессировать молекулы главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex (MHC) и провоспалительные цитокины наделяет микроглию свойствами антигенпрезентирующих клеток [64].

При вирусной инфекции, основную функцию развития врождённого и в дальнейшем адаптивного иммунного ответа нервной системы берут на себя макрофаги, дендритные клетки и астроциты [58]. В отличие от микроглии, астроциты (макроглия) в состоянии покоя и активации экспрессируют преимущественно TLR3, характерные для распознавания вирусов. Исследования TLR3 сигнализации выявили секрецию провоспалительных цитокинов: IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL-10, IL-10 и IFN- $\beta$  [139]. Различие цитокинового профиля при вирусных и бактериальных нейроинфекциях подтверждается данными многочисленных исследований [4,140]. Основной функцией цитокинов является: вовлечение эпителиальных, эндотелиальных,

дендритных и других клеток в сферу защитной реакции, а также стимулирование миграции лейкоцитов в очаг воспаления.

Механизмы проникновения гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов через мозговые барьеры в субарахноидальное пространство опосредованы различными типами молекул клеточной адгезии (МКА). Многоступенчатый процесс проникновения лейкоцитов из кровотока в ЦНС включает в себе четыре основных процесса: роллинг, прикрепление, адгезия и трансэндотелиальная миграция [41,80,89,90]. Способность лейкоцитов проникать через барьеры мозга в ликвор и нервную ткань продемонстрирована в модельных экспериментах на культурах клеток [138,163] и экспериментальных животных [79]. Обнаружено, что в стимулированном TNF- $\alpha$  монослое человеческих эндотелиальных клеток, по сравнению с нестимулированным, трансэндотелиальная миграция Т-клеток увеличивалась в 30 раз [163]. Этот факт подтверждает гипотезу, что одним из условий трансмиграции лейкоцитов через мозговые барьеры должно быть состояние активации как проникающих иммунных (лейкоциты), так и барьерных клеток (эндотелий, эпителий) [145]. Однако, несмотря на единый принцип проникновения клеток через барьеры мозга, в процессе трансмиграции Т-, В- и НК клеток задействованы разные варианты МКА, как со стороны эпителиальных клеток, так и лейкоцитов [90].

Проникая в ЦСЖ, иммунокомпетентные клетки выполняют свойственные им функции. Первыми из лейкоцитов в субарахноидальное пространство попадают нейтрофилы. Они участвуют в механизмах защиты от бактериальных и грибковых инфекций в основном за счёт фагоцитоза и генерации активных форм кислорода (ROS), высвобождения гранул и внеклеточных нейтрофильных ловушек (NETs). В последние годы важным переосмыслением роли Ne в процессе развития воспаления стало их прямое и косвенное участие в регуляции адаптивного иммунного ответа [97].

В процессе прохождения ГЭБ/ГЛБ фенотип иммунокомпетентных клеток меняется под воздействием микроокружения. Минуя эндотелиальный

барьер, взаимодействуя в строме с антигенпрезентирующими клетками лимфоциты претерпевают рецептор-зависимую активацию, пролиферацию, а также антиген-специфическую дифференцировку. Периваскулярные макрофаги, микроглия, дендритные клетки выступают как антигенпрезентирующие клетки и облегчают инфильтрацию CTL [68]. В ЦСЖ лимфоциты реализуют эффекторные механизмы клеточного и гуморального адаптивного иммунитета. Th участвуют в регуляции воспалительного процесса. Показано, что в процессе нейровоспаления среди Т-лимфоцитов наибольшей предрасположенностью к инфильтрации обладают наивные CTL и эффекторные Th [160]. Как было продемонстрировано в большинстве работ, Т-лимфоциты и их субпопуляции Th являются главными регуляторами клеточного иммунного ответа в остром периоде как вирусного, так и бактериального гнойного менингита, вне зависимости от возраста [6,74,81,92,109]. CTL и NK уничтожают зараженные клетки, как в специфическом, так и неспецифическом варианте [111]. В-лимфоциты продуцируют антитела, выступают в качестве антигенпрезентирующих клеток и регуляторов воспаления, модулируя активность Т-лимфоцитов и продуцируя цитокины [117]. Роль В-лимфоцитов в ЦСЖ при вирусных менингитах незначительна, тогда как при нейроинфекциях бактериальной этиологии, включая бактериальный гнойный менингит, зафиксировано увеличение их содержания [81,92].

Обратной стороной нейровоспаления с привлечением иммунокомпетентных клеток является их участие в повреждении тканей мозга [43,52]. Нарушение процессов дифференциации, чрезмерное воспаление, а также цитокиновый дисбаланс являются причиной появления патологических фенотипов иммунных клеток, которые приводят к различным повреждениям нейронов мозга, вызывая неврологический дефицит. Показана двоякая роль CTL при нейровоспалительных процессах: с одной стороны, эти лимфоциты уничтожают заражённые клетки, с другой могут участвовать в деградация нервной ткани и аутоиммунных процессах

[98,111]. НК также играют важную роль в контроле инфекции в норме и при патологиях ЦНС, однако, в некоторых случаях возможно случайное повреждение нервной ткани [132].

Конечным этапом патогенеза и саногенеза менингита является окончательная элиминация патогена и продуктов их метаболизма из ликвора и менингеальных оболочек мозга. Санация ЦСЖ характеризуется снижением плеоцитоза (клеточно-опосредованное уничтожение, миграция в региональные лимфатические узлы через менингеальную лимфатическую систему [113], апоптоз), уровня цитокинов, процессами репарации [57] повреждённой нервной ткани и формированием иммунологической памяти [60]. Таким образом, проникновение возбудителя менингита сквозь слизистые оболочки и далее через ГЭБ/ГЛБ, вызывает каскад защитных реакций врождённого и адаптивного иммунитета, как в системном кровотоке, так и на уровне мозговых оболочек (ЦНС). Развитие нейровоспаления, приводит к инфильтрации иммунокомпетентных клеток в ЦНС для иммунологического надзора инфекционного процесса. В течении манифестации менингита пул лимфоцитов играет важную роль регуляторов и эффекторов иммунного ответа во всех тканях и органах макроорганизма. Различные субпопуляции лимфоцитов, наделённые уникальными функциональными характеристиками, отвечают за связь врождённого иммунитета с адаптивным, за развитие клеточного и гуморального адаптивного ОИ, за процессы репарации, но также могут участвовать в повреждении нервной ткани при чрезмерном воспалении или аутоиммунных реакциях. Вследствие вышеперечисленного - лимфоциты являются важными факторами иммунных реакций в патогенезе инфекционных заболеваний, включая менингит, где происходит поражение нервной ткани.

## 1.2. Разнообразие фенотипов лимфоцитов и их функциональные характеристики

Исходя из важной роли лимфоцитов в патогенезе менингитов перспективной задачей клинической лабораторной диагностики является

внедрение методов, позволяющих с высокой точностью определить количественный состав различных субпопуляций в биологических жидкостях. По современным представлениям лимфоциты различаются по функциональным свойствам, что выражается в разнообразии дифференцировочных антигенов или кластеров дифференциации (CD) представленных на клеточной мембране. Последние представляют собой мембранные рецепторы, обеспечивающие межклеточное взаимодействие, внутриклеточную передачу сигнала при контакте с различными антигенами и лигандами и другие функции.

В последние годы стало возможным проводить фенотипирование лимфоцитов с помощью различных технологий, использующих специфические антитела, флуоресцентные и другие метки. К числу наиболее информативных и значимых относится метод ПЦ. При его использовании выделение лимфоцитарного пула чаще всего происходит по общему для всех лимфоцитов дифференцировочному антигену CD45 (Табл. 1).

Таблица 1 - Фенотипы основных субпопуляций лимфоцитов и характеристика кластеров дифференцировки.

| Кластер дифференцировки (CD) | Характеристики кластеров дифференцировки   |
|------------------------------|--|
| CD45                         | Общий лейкоцитарный антиген. Тирозиновая протеинфосфатаза.   |
| CD3                          | Мультипротеиновый комплекс на поверхности Т-лимфоцитов. Состоит из 4 субъединиц: CD3 $\gamma$ , CD3 $\sigma$ и 2х CD3 $\epsilon$ . Структурный компонент Т-клеточного рецептора. |
| CD4                          | Ко-рецептор $\alpha\beta$ субъединиц Т-клеточного рецептора. Специфический маркер Th, специфичен для МНС II.   |
| CD8                          | Ко-рецептор $\alpha\beta$ субъединиц Т-клеточного рецептора. Специфический маркер CTL, специфичен для МНС I.   |
| CD19                         | Белок, обладает протеинкиназной активностью, ко-рецептор В-клеточного рецептора, снижает порог антигенной рецептор-зависимой стимуляции.   |
| CD16                         | Гликопротеин. Fc-рецептор низкой аффинности для IgG. Опосредуют фагоцитоз, цитокинпродукцию и активирует антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность.             |
| CD56                         | Гликопротеин семейства Ig (молекула клеточной адгезии).  |



В КЛД общепринято оценивать клеточный иммунный ответ на инфекцию путём исследования пяти основных субпопуляций лимфоцитов: общих Т-клеток с их субпопуляциями Th и CTL, а также В-клеток и NK [28]. Все Т-клетки несут на своей поверхности мультипротеиновый комплекс (CD3), состоящий из четырех субъединиц, которые являются структурными компонентами Т-клеточного рецептора (Табл. 1). Т-лимфоциты обеспечивают адаптивный клеточный иммунный ответ за счёт регуляторных Т-хелперов (Th) и эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) (Табл. 2).

Таблица 2 - Фенотипы и биологическая функция основных и малых субпопуляций лимфоцитов.

| Субпопуляции лимфоцитов                | Фенотип  | Биологическая функция   |
|--|--|---|
| T-cells                                | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>                                     | Обеспечивают клеточный адаптивный иммунный ответ, регулируют гуморальный иммунный ответ.  |
| Th                                     | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>                    | Участвуют в регуляции адаптивного иммунного ответа.   |
| CTL                                    | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>                    | Участвуют в уничтожении зараженных патогенами клеток (цитотоксическая активность) и продукции цитокинов.  |
|  | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>                   | Участвуют в уничтожении заражённых клеток. Проявляют сильную цитотоксическую активность (истинные цитотоксические лимфоциты) [55].  |
|  | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>                  | Проявляют слабую цитотоксическую активность [55]. Имеют замедленную пролиферацию, нарушенную передачу сигналов Т-клеточного рецептора, экспрессируют отличный от CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup> профиль цитокинов.  |
| NK                                     | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> | Обеспечивают функционирование врождённого иммунитета, уничтожают инфицированные патогенами клетки (цитотоксичность), регулируют иммунный ответ с помощью продукции цитокинов (ранний IFN-γ).  |
| B-cells                                | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>                   | Обеспечивают гуморальный иммунитет за счёт продукции антител. Являются вторичными антигенпрезентирующими клетками. Регулируют клеточный иммунитет за счёт продукции цитокинов (IFN-γ)   |
| NKT (Natural Killer T-cells)           | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup>  | Связывают врождённые иммунные реакции со специфической иммунореактивностью [2]. Модулируют активность моноцитов, Т- и В-лимфоцитов и NK клеток за счёт продукции широкого спектра цитокинов. Проявляют цитотоксическую активность.        |
| Двойные негативные Т-лимфоциты (DN)    | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>   | Связывают врождённые и адаптивные иммунные реакции. Модулируют активность макрофагов, CTL и В-лимфоцитов за счёт продукции широкого спектра цитокинов от провоспалительных (IL-2, TNF-α, IFN-γ) до противовоспалительных (IL-10) [47].    |
| Двойные положительные Т-лимфоциты (DP) | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>   | Участвуют в регуляции иммунного ответа за счёт продукции цитокинов [87], в том числе проявляют иммуносупрессивную активность [49]. Участвуют в уничтожении преимущественно заражённых вирусами клеток (цитотоксическая активность) [121]. |
| NK subset                              | CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>                    | Обеспечивают функционирование врождённого иммунитета и его связь с адаптивными иммунными реакциями. Проявляют цитотоксическую активность [42].  |

Т-лимфоциты контролируют работу В-лимфоцитов, ответственных за гуморальный иммунный ответ. В составе Т-клеточного рецептора зрелых Th присутствует специфический маркер CD4, у зрелых CTL маркер CD8, что является основой для выделения этих субпопуляций при помощи проточной цитометрии.

Взаимодействие комплекса пептид – МНС II с Т-клеточным рецептором наивных Т-хелперов (Th0) приводит к их активации (активированные Th). В дальнейшем при воздействии микроокружения клетки начинают пролиферировать и дифференцироваться в специализированные субпопуляции Th: Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh, Treg. Каждая из данных субпопуляций лимфоцитов отвечает за набор реакций, который приводит к наиболее эффективному иммунному ответу против конкретных патогенов. Функцией цитотоксических Т-лимфоцитов является антиген-специфический лизис инфицированных внутриклеточными патогенами клеток. На основе разной интенсивности флуоресценции установлена гетерогенность популяции Т-клеток, экспрессирующих CD8, – с высокой (истинные цитотоксические Т-лимфоциты, CD8<sup>bright</sup>) и низкой интенсивностью (CD8<sup>dim</sup>). CD3<sup>+</sup>CD8<sup>bright</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup> клетки различаются уровнем экспрессии цитокинов и функциональными характеристиками [55]. Campbell J. с соавторами провели исследование разных CD8<sup>+</sup> субпопуляций лимфоцитов в крови здоровых молодых мужчин, подвергшихся интенсивным физическим нагрузкам [42]. Авторы показали, что в покое часть CD8<sup>+</sup> лимфоцитов крови не экспрессируют характерный для Т-лимфоцитов маркер CD3. CD3<sup>-</sup>CD8<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> клетки охарактеризовали как одну из субпопуляций NK. Сразу после физических упражнений был установлен значительный рост в крови относительного содержания CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK, в то время как содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup> Т-клеток не изменялось. Показано, что в крови здоровых доноров субпопуляция CD3<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>) клеток составляет 0,2 - 7% от числа всех CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-клеток [149]. В исследовании,

проведённом в острой стадии ВИЧ-инфекции у взрослых, был выявлен рост в крови субпопуляции  $CD3^+CD8^{dim}$  Т-лимфоцитов, существенная часть которых были HIV-специфическими [55]. Данная субпопуляция в сравнении с  $CD3^+CD8^{br}$  Т-лимфоцитами характеризовалась низким потенциалом ингибирования репликации вируса. Рост этой субпопуляции прямо коррелировал с вирусной нагрузкой и клиническими предикторами быстрого прогрессирования HIV-инфекции. Авторы связывают неэффективность ответа  $CD8^+CTL$  при HIV-инфекции с ранней экспансией функционально неполноценных  $CD3^+CD8^{dim}$  HIV-специфических Т-клеток.

В последние десятилетия установлено, что кроме «классических» Th и CTL в циркуляции присутствуют различные функциональные варианты Т-лимфоцитов, такие как Double Positive (DP) и Double Negative (DN) Т-лимфоциты (по маркерам CD4 и CD8) [26,27,28,32]. Ранее эти клеточные субпопуляции рассматривали как промежуточные формы созревания Th и CTL. Однако позднее было установлено, что молекулы CD4 и CD8 могут ко-экспрессироваться либо отсутствовать на зрелых Т-лимфоцитах, являясь активными участниками иммунного ответа в периферической крови и в зоне воспаления [172]. В последнее время интерес к этим субпопуляциям Т-лимфоцитов возрос в связи с изучением их роли в патогенезе воспалительных и аутоиммунных, включая заболевания ЦНС [159].

DP Т-лимфоциты составляют до 2% от общего числа Т-клеток в крови здоровых людей и способны накапливаться в больших количествах в ЦСЖ [120,159]. У DP лимфоцитов обнаружены цитотоксический потенциал [87] и иммуносупрессорная активность [49]. Показано, что DP Т-клетки являются антиген-специфическими клетками памяти с высокой противовирусной активностью, с функциями как  $CD4^+$ , так и  $CD8^+$  Т-клеток: продуцируют цитокины характерные для Th1 и обладают цитотоксичностью на уровне  $CD8^+$  CTL. Рост этой малой субпопуляции Т-клеток обнаружен при ряде хронических вирусных инфекциях (EBV, HIV) и аутоиммунных заболеваниях поражающих нервную систему, таких как рассеянный склероз

[27,28,159]. Установлено активное участие субпопуляции DP T-клеток в патогенезе острой HIV-инфекции, при которой DP T-клетки проявляли повышенную пролиферативную активность и многофункциональность в ответ на стимуляцию HIV антигенами *in vitro*, независимо от основных субпопуляций антиген-специфических T-лимфоцитов [63].

DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) T-лимфоциты в периферической крови составляют от 3-5% всех T-клеток [165]. Они участвуют как во врождённом (TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> DN T-лимфоциты), так и адаптивном иммунитете (TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> DN T-лимфоциты), модулируя активность макрофагов, CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов и В-клеток. DN T-лимфоциты являются гетерогенной субпопуляцией и в разных пропорциях встречаются при вирусных, бактериальных и паразитарных инфекциях. В зависимости от фенотипа они проявляют широкий спектр иммунных реакций – от продукции провоспалительных цитокинов (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) до супрессии антиген-специфического T-клеточного ответа (IL-10) [47]. Исследования показывают, что DN T-лимфоциты при различных инфекционных заболеваниях выполняют как защитные, так и патологические функции [165].

Наиболее изученными среди малых субпопуляций T-лимфоцитов на сегодняшний день являются NKT клетки, ко-экспрессирующие T-клеточный рецептор и маркеры характерные для натуральных киллеров [2,28,93,108,131,134,147,169]. В крови здоровых доноров число NKT колеблется от 0,5 до 6,0% [28]. Клетки данной субпопуляции подразделяются на 2 группы: инвариантные NKT клетки (iNKT), распознающие липидные антигены микробов, представленные рецепторами CD1d и NKT-подобные клетки (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T-клетки), распознающие антигены, представленные комплексом МНС. NKT способны активировать созревание моноцитов в ответ на воздействие антигена [75], модулировать активность CD4<sup>+</sup> T-лимфоцитов, NK и В-клеток [100]. Эксперименты, проведенные на заражённых вирусом мышам, показали, что NKT реализуют защитную функцию за счёт изменения профиля цитокинов и специфического

иммунного ответа на вирус [151]. Активированные НКТ продуцируют большие количества цитокинов: IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), которые модулируют иммунные реакции НК, Т- и В-лимфоцитов [108]. Показана важная роль НКТ в иммунной защите от ряда бактерий, включая нейротропные *B. burgdorferi* и *S. pneumoniae* (возбудитель пневмококкового менингита) [169]. Однако НКТ вносят существенный вклад и в противовирусный ИО, хотя соответствующие антигены еще не определены. В эксперименте на мышах показано, что НКТ контролируют инфекцию, вызванную вирусом герпеса простого I типа, снижая летальность и поражение мозга зараженных мышей [131]. Среди немногих клинических исследований Vanovic T. и соавт. [37] описывают ребенка с дефицитом НКТ и низкой экспрессией CD1d, у которого после вакцинации против ветряной оспы развилась диссеминированная инфекция, вызванная вирусом ветряной оспы (VZV). Fernandez C. и соавторы [59] обнаружили снижение числа НКТ в крови ВИЧ-инфицированных лиц уже через 4 месяца после заражения.

НК являются важнейшим элементом системы врождённого иммунитета. Они обладают цитокин-продуцирующей активностью и цитотоксичностью, выполняя функции эффекторов, уничтожающих заражённые вирусом клетки. Чаще всего для выделения данной субпопуляции лимфоцитов методом проточной цитометрии используют маркеры CD16 (Fc-рецептор низкой аффинности для IgG) и CD56 (рецептор клеточной адгезии, участвующий в межклеточном взаимодействии НК и клеток-мишеней) [20]. Кроме CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, молекула CD8 с низкой интенсивностью может экспрессироваться на CD3<sup>-</sup>лимфоцитах (CD3<sup>-</sup>CD8<sup>dim</sup>). Эти клетки экспрессируют CD16 и CD56, являясь одной из субпопуляций НК [42]. Согласно литературным источникам CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>НК экспрессируют более высокие уровни перфорина в сравнении с CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup> [127]. При этом снижение данной субпопуляции в совокупности с низкой экспрессией перфорина и дисфункцией НК ассоциировано с хроническим гепатитом С [122].

В-лимфоциты - основные клетки гуморального звена иммунитета. Для выделения данной фракции лимфоцитов методом проточной цитометрии чаще всего используют маркеры CD19 и CD20, которые присутствуют на всех стадиях дифференцировки В-клеток, кроме плазматических клеток. Главной функцией В-лимфоцитов является продукция защитных антител. Однако, не менее важным является способность В-лимфоцитов активированных антигенами представлять их фрагменты в составе комплекса МНС, реализуя тем самым роль антигенпрезентирующих клеток. Эта способность делает В-лимфоциты важным звеном врождённого и адаптивного иммунитета. В-лимфоциты подразделяются на две группы: В-2 – обычные В-лимфоциты и В-1 – противобактериальная малая субпопуляция (около 5% В-клеток) в основном располагающаяся в прибарьерных полостях. В последнее время появляются данные о регуляторных свойствах В-лимфоцитов. Так, они способны к продукции цитокинов (IFN- $\gamma$ ) и презентации антигенов, что делает их важным элементом регуляции врождённого и адаптивного иммунного ответа [38].

### 1.3. Современные способы клинко-лабораторной диагностики менингитов

Диагностика менингита любой этиологии проводится с использованием синдромального подхода. Наличие синдрома общей интоксикации, повышенного внутричерепного давления, отёка и набухания головного мозга, менингеальный синдром являются основными клиническими критериями диагностики менингита [15]. Первые симптомы менингита часто неспецифичны и включают лихорадку, головную боль, рвоту, менингеальные признаки. Однако, как отмечено в работе Шишова и соавторов, [30] их диагностическая ценность при дифференциации менингита вирусной и бактериальной природы крайне незначительна и может снижаться при некачественно собранном анамнезе.

В целом, клиническая картина менингита определяется этиологией и возрастом больного. Бактериальными гнойными менингитами болеют чаще

дети первых лет жизни [9], тогда как серозными вирусными преимущественно заболевают дети 5-9 лет [19,31]. Согласно литературным данным ВМ в основном протекает в среднетяжелой и лёгкой форме, с невысокой частотой осложнений и низкой летальностью, которая в основном связана с печёночной недостаточностью, а не с поражением центральной нервной системы [31]. Напротив, БГМ у детей преимущественно имеет тяжёлое течение и высокую летальность [9,12]. Тяжёлое и крайне тяжёлое течение менингитов обусловлено развитием осложнений, являющихся причиной летальных исходов, неврологических и соматических нарушений, приводящих к инвалидизации. Среди осложнений основными являются острая церебральная недостаточность (отёк, набухание головного мозга, церебральный инфаркт, субдуральный выпот и др.), острые экстрацеребральные осложнения (ДВС-синдром, септический шок, полиорганная недостаточность) [9]. У многих пациентов выявляются различные резидуальные явления, такие как атаксия, глухота, нарушение работы внутренних органов, неврологический дефицит и другие, которые служат причиной инвалидизации, при некоторых формах БГМ от 5 до 40% случаев [1].

При анализе гемограммы больных менингитом в целом отмечают лейкоцитоз, резкий или умеренный сдвиг влево и увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Однако, существуют этиологические особенности показателей крови пациентов с менингитом. Так, в гемограмме детей с менингитом менингококковой этиологии отмечают гиперлейкоцитоз, резкий сдвиг влево, значительное ускорение СОЭ. При гемофильном менингите – умеренный лейкоцитоз и нейтрофилёз, ускорение СОЭ. Исследование гемограммы при пневмококковом менингите выявляет нейтрофильный лейкоцитоз, ускорение СОЭ, при сепсисе – снижение содержания гемоглобина и эритроцитов, тромбоцитопению [15]. Изменения гемограммы больных вирусным серозным менингитом не несут характерных особенностей. В острый период инфекции в клиническом анализе крови у

большинства пациентов обнаруживается нейтрофилёз [31]. В рутинной лабораторной практике более специфичным маркером бактериальной или вирусной инфекции в крови является показатель С-реактивного белка (СРБ). Общепринято, что при вирусных инфекциях его концентрация в сыворотке ниже 50 мг/л, тогда как при бактериальных выше 50 мг/л.

Люмбальная пункция (ЛП) является обязательной процедурой при подозрении на нейроинфекционный процесс, так, как только исследование ЦСЖ отражает состояние процессов в интратекальном пространстве. Характер воспалительных изменений ЦСЖ в совокупности с клинической картиной является основным дифференциально-диагностическим критерием менингита. Воспалительными изменениями ЦСЖ, подтверждающими диагноз менингит, являются повышение количества клеток и (или) изменение клеточного состава. В клинической лабораторной диагностике принято считать, что при вирусном менингите плеоцитоз в основном лимфоцитарный, тогда как при бактериальном нейтрофильный. Однако, этот критерий подвержен значительной вариабельности в зависимости от возраста пациентов, времени диагностической ЛП, наличия осложнений и других факторов [29].

Характерными воспалительными изменениями ЦСЖ при серозном вирусном менингите является умеренный смешанный или лимфоцитарный плеоцитоз (количество клеток колеблется от 50 до 1000 кл/мкл). Количество белка сохраняется в пределах нормы или увеличивается незначительно, содержание сахара и хлоридов не изменяется. В первые часы вирусного менингита, а в некоторых случаях до нескольких дней инфекции, в ЦСЖ больных доминируют нейтрофилы [114]. Нейтрофильный плеоцитоз ЦСЖ больных вирусными заболеваниями ЦСЖ чаще встречается у пациентов младшего возраста [83]. При этом нейтрофильный плеоцитоз ЦСЖ являлся основанием назначения антибиотика в первые несколько суток заболевания до получения результатов ПЦР-диагностики (полимеразная цепная реакция) на наличие вирусных нуклеиновых кислот [31].



При БГМ характер воспалительных изменений зависит от этиологии возбудителя и срока диагностической пункции. Так, при менингококковом менингите при ЛП в первые сутки заболевания ЦСЖ часто опалесцирующая или бесцветная, цитоз от 10-300 кл/мкл, смешанный или реже лимфоцитарный. ЛП на вторые сутки – ЦСЖ мутноватая, плеоцитоз нейтрофильный от 500-1000 кл/мкл. При гемофильном менингите воспалительные изменения ликвора характеризуются высоким нейтрофильным плеоцитозом (более 1000 кл/мкл) и клеточно-белковой диссоциацией, уровень белка обычно повышен (1-6 г/л) [15]. При пневмококковом менингите воспалительная диссоциация ЦСЖ не характерна, наблюдается умеренный нейтрофильный плеоцитоз (800 – 1200 кл/мкл) с умеренным повышением белка.

В настоящее время иммунофенотипирование лимфоцитов крови является важным диагностическим инструментом оценки нарушения иммунной системы при инфекционных и других заболеваниях. Для правильной интерпретации данных клеточного иммунитета большое значение имеет их сопоставление с показателями у здоровых детей. В ряде работ приводятся данные о субпопуляционном составе лимфоцитов крови детей и их возрастные нормы [51,73,148]. Показано, что с возрастом относительное содержание всех основных и малых субпопуляций лимфоцитов в крови здоровых детей претерпевает значительное изменение, связанное с развитием иммунной системы и организма в целом.

Исследование иммунологических показателей (содержание различных популяций лейкоцитов) у детей выявило существенные различия в зависимости от возраста, пола [51], вариабельности генотипа, а в пре- и постнатальном периоде вследствие разнообразия внешних воздействий [123]. Из литературных источников известно, что наиболее выраженными являются изменения состава лимфоцитов крови у детей до года, и во время пубертатного периода [66,123]. При этом изменение относительного

содержания субпопуляций лимфоцитов наблюдается вплоть до преклонного возраста [73].

С возрастом в крови в целом снижается относительное содержание лимфоцитов относительно других лейкоцитов [65]. Среди субпопуляций лимфоцитов в крови детей с возрастом наблюдается увеличение относительного содержания CTL, NK, DNT-лимфоцитов и снижение Th, DPT-лимфоцитов [51]. Вследствие перераспределения Th и CTL с возрастом более чем в два раза снижается коэффициент Th/CTL. Доля В-лимфоцитов в крови увеличивается до 12 месяцев, затем до 18 лет сокращается почти вдвое [51]. Абсолютное содержание всех субпопуляций лимфоцитов в крови здоровых людей с возрастом (от 1 дня до 70 лет) сокращается [73].

Отсутствие стандартизированного подхода к оценке возрастных изменений иммунологических параметров в крови вызывают трудности интерпретации и ошибки в оценке отклонения иммунных процессов при различных заболеваниях, включая инфекционные. Для Российской Федерации на сегодняшний день существуют единичные работы по нормативным значениям субпопуляций лимфоцитов, полученным в том числе методом ПЦ, для детей 1-6 и 7-17 лет [25] и для взрослых здоровых доноров 20-45 лет [26].

Сложность исследования состава ЦСЖ обусловлена относительно низким количеством в ней клеток и биохимических субстанций. Исследование клеток ЦСЖ в рутинной практике проводится с помощью световой микроскопии окрашенного мазка. В нормальном ликворе содержится незначительное количество лейкоцитов, состоящих в основном из лимфоцитов, которые являются важным фактор в обеспечении гомеостаза мозга в норме и при патологии. У детей до года показатели цитоза в нормальном ликворе колеблются от 0-30 кл/мкл и постепенно снижаются к пубертатному возрасту (0 - 10 кл/мкл), достигая 0-5 кл/мкл у взрослых [29].

Для более детальной морфологической характеристики клеток ЦСЖ с использованием современных методов исследования проводят их

предварительное сгущение с использованием цитоцентрифуг. Для исследования субпопуляций лимфоцитов в ЦСЖ наиболее чувствительным на сегодняшний день является ПЦ, использующая флуоресцентные антитела. В 1994 году предпринята попытка стандартизации протоколов изучения выделенных из ЦСЖ клеток методом ПЦ. Рекомендовано использование специализированных буферных растворов, обеспечивающих лучшую, чем в естественной среде, выживаемость лимфоцитов, что позволило дифференцировать некоторые субпопуляции лимфоцитов, в частности Т- и В-лимфоциты [54].

Данные о субпопуляционном составе ЦСЖ в «норме» единичны. Как правило, в качестве условной нормы используют ЦСЖ пациентов, ЛП которым проведена для исключения серьёзной патологии, включая нейроинфекционную. В ранних работах Svenningsson и соавторы определяли относительное содержание (%) субпопуляций лимфоцитов ЦСЖ и крови у 34 здоровых доноров (средний возраст 25 лет (22-32) [142]. Было выявлено значительное доминирование в ЦСЖ  $CD3^+$  Т - клеток (97%), при небольшом количестве  $CD3^-$  негативных субпопуляций (В-лимфоциты - 0,8% и НК - 2,2%). В работе Zeman и соавт. (2022), согласно данным фенотипирования 15 образцов ЦСЖ доноров без признаков органической неврологической патологии, получены следующие референсные значения для субпопуляций лимфоцитов: Т-лимфоциты (84,1 - 100%), В-лимфоциты (0,0 - 1,5%), НК - (0,0 - 6,3%), НКТ - (0,0 - 9,5%), DN (0 - 13,1%) и  $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$  - (0,8 - 4,9) [170]. В работе de Graaf (2010) выявлены существенные количественные отличия крови и ЦСЖ по всем основным субпопуляциям: преобладание в ЦСЖ Т-клеток и низкое содержание В и НК [69]. По данным авторов большинство Т-клеток в ЦСЖ имеют фенотип  $CD4^+$  (более 70%) [69].

В единичных работах [74] проведено исследование возрастных особенностей субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора в группе больных с различными заболеваниями ЦНС, включая нейроинфекции, и условно здоровых детей. Корреляционный анализ выявил увеличение

относительного содержания Th и сокращение НКТ в ликворе с возрастом [74]. При этом референсных значений субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора в норме для детей разных возрастов в доступной литературе не найдено.

Данные о значимости ССЛ для диагностики менингитов немногочисленны. В ряде работ приводятся данные фенотипирования лимфоцитов при вирусном и бактериальном менингите [81,92,105,109,141,143,153]. Однако, различный дизайн исследований затрудняет сопоставление полученных результатов. Так, Ulchihara с соавторами при вирусном менингите установили увеличение количества  $CD3^+$  Т-клеток,  $CD4^+$  Th и снижение  $CD8^+$  CTL в ЦСЖ по сравнению с показателями крови тех же больных [153]. Схожие закономерности выявлены в работах [105,141]. В дальнейшем Svenningsson и соавторы смогли сравнить субпопуляционный состав лимфоцитов при вирусном менингите с показателями «нормального» ликвора и не выявили значимых отличий в содержании Т-клеток. Однако авторы обнаружили, что в ЦСЖ больных VM в сравнении со здоровыми, была выше доля Th, тогда как содержание CTL было значительно ниже [141]. Исследования состава лимфоцитов ЦСЖ в динамике вирусного менингита проведены Tabata N. [143] и в дальнейшем Sakatoku H. [129]. Полученные авторами результаты также указывали на доминирование  $CD3^+$  Т-лимфоцитов в ЦСЖ пациентов как в острую фазу заболевания, так и в стадии реконвалесценции. При этом отмечено, что в динамике существенные изменения претерпевает относительное содержание  $CD4^+$  и  $CD8^+$  субпопуляций. В острую фазу вирусного менингита в ЦСЖ выявлено доминирование  $CD4^+$  Th, тогда как к периоду реконвалесценции наблюдали увеличение роли  $CD8^+$  CTL [129]. Вследствие этого отношение Th/CTL ( $CD4/CD8$ ) в динамике VM уменьшалось, тогда как, в крови оно оставалось прежним [143]. Подобные изменения в дальнейшем были зафиксированы и в других исследованиях [105,156], что по мнению авторов

свидетельствует об увеличении роли интратекальных эффекторных клеток в динамике вирусного менингита.

Исследование фенотипов лимфоцитов крови и ЦСЖ методом проточной цитометрии при БГМ у детей проведено Ichiyama T. с соавторами [81]. Авторами показано, что содержание общих Т-лимфоцитов в ЦСЖ было достоверно выше их содержания в крови, однако несколько ниже, чем в крови здоровых детей. Содержание субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> в ЦСЖ пациентов было достоверно выше, чем в крови и сопоставимо с показателями их относительного содержания в крови здоровых доноров [81]. Авторы предположили, что снижение Т-клеточной субпопуляции в крови больных БГМ связано с большой инфильтрацией данной субпопуляции клеток в ЦСЖ [81]. Исследование содержания В-лимфоцитов и НК в ЦСЖ и крови проводилось всего в нескольких работах. В двух из них они исследованы в составе пяти основных субпопуляций [105,92], в остальных исследовались только Т- и В-клетки [81,141,153]. В работе Lucht F. [105] показано, что при вирусном менингите в ЦСЖ содержание В-лимфоцитов ( $3,8 \pm 2,0$ ) в острую фазу заболевания было достоверно снижено по сравнению с показателями крови ( $12,4 \pm 7,2$ ) тех же пациентов и показателей крови здоровых доноров. Содержание НК достоверно не различалось в ЦСЖ и крови пациентов с ВМ и не имело отличий от показателей в крови здоровых людей [105]. В работе группы Kowarik M.C. обнаружено низкое, относительно остальных Т-лимфоцитов, содержание В-клеток и НК в ЦСЖ взрослых пациентов с вирусными и бактериальными менингитами [92]. Также не выявлено достоверных отличий этих субпопуляций при исследованных нозологических формах [92]. Согласно литературным источникам, содержание В-клеток в ЦСЖ острого периода было значительно ниже по сравнению с кровью как у больных ВМ [105], так БГМ [81] было достоверно ниже показателей в крови.

Исследования НКТ при БГМ у взрослых проводили Балмасова И.П. и соавторы, которые выявили увеличение абсолютного числа НКТ в крови больных пневмококковым менингитом [6]. В ЦСЖ больных пневмококковым

менингитов увеличение абсолютного числа  $CD3^+CD56^+NKT$  клеток ассоциировалось с тяжёлым течением заболевания, что было связано с иммуносупрессорной функцией этой субпопуляции. Информации об участии других малых субпопуляций в патогенезе менингитов в доступной литературе выявлено не было.

Таким образом, при менингитах недостаточно изучена динамика субпопуляций лимфоцитов крови и ликвора, нет работ с привлечением расширенного спектра малых субпопуляций и их роли в патогенезе и диагностике менингита, мало данных о возрастных особенностях, а также отсутствует информация о связи субпопуляционного состава лимфоцитов со степенью тяжести и стандартными лабораторными показателями крови и ЦСЖ. При этом неспецифичность клинических проявлений, низкая эффективность лабораторных показателей крови, недостаточная эффективность методов верификации возбудителя, а также смешанный плеоцитоз ликвора, затрудняют дифференциальную диагностику менингита. Необходимы дополнительные методы лабораторной диагностики менингита для уточнения диагноза, оценки состояния пациента, а также для прогноза риска развития осложнений и неблагоприятного исхода заболевания. Разработка дополнительных критериев, основанных на патогенезе, является актуальной задачей клинической лабораторной диагностики менингита.

## Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на биологическом материале (кровь, ликвор) детей, поступивших на лечение в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России с диагнозом менингит и ОРВИ с менингизмом с разрешения локального этического комитета: протокол № 93 от 07.11.17.

**Характеристика когорты.** Проведено клинико-лабораторное обследование 152 детей с диагнозом: ВМ (n=86) от 0,3 до 17,3 лет, 9,5 (Me), БГМ (n=39) от 0,25 до 15 лет, 2,9 (Me) и 27 детей с острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ, с менингизмом) от 2,4 до 17,8 лет (8 лет по медиане) в качестве группы сравнения. Диагноз установлен на основании клинико-лабораторного обследования и указан в выписном эпикризе истории болезни. Этиологическая диагностика проведена в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России с применением стандартных микробиологических и серологических методов, метода полимеразной цепной реакции. Критерием исключения являлось наличие хронических инфекционных заболеваний (гепатит), туберкулезный менингит. Для иммунофенотипирования лимфоцитов использованы остатки образцов крови и ЦСЖ, поступающие для стандартного лабораторного исследования.

Группы обследованных детей были сопоставимы по соотношению мальчиков и девочек. В группе детей, переносящих ВМ и БГМ, преобладали мальчики (66% и 59% соответственно) (табл. 3).

Таблица 3 - Половой состав исследуемой когорты пациентов.

| Заболевание                            | Мальчики<br>(n/%) | Девочки<br>(n/%) | Общее кол-во<br>(n) |
|--|-------------------|------------------|---------------------|
| Острая респираторная вирусная инфекция | 13/48 %           | 14/52 %          | 27                  |
| Вирусный серозный менингит             | 57/66 %           | 29/34 %          | 86                  |
| Бактериальный гнойный менингит         | 23/59 %           | 16/41 %          | 39                  |

В группе сравнения количество мальчиков и девочек было приблизительно равным (13 мальчиков и 14 девочек). Сравнение полового состава исследуемых групп не выявило достоверных отличий.

В качестве группы сравнения проведено клинико-лабораторное обследование 27 детей с диагнозом острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ), протекающей с менингизмом. Кровь и ЦСЖ больных менингитами исследовали в динамике: в остром периоде (в течение первых 5 суток от начала болезни, до лечения) и в периоде ранней реконвалесценции: через 12-15 дней при ВМ и 6-13 дней при БГМ, детей с ОРВИ - однократно в остром периоде заболевания. Все исследования проводились в день забора биологического материала.

В связи с известным фактом об изменении количественного соотношения лейкоцитов крови у детей разного возраста, полученные результаты рассматривались не только в целом по группам ВМ и БГМ, но и в соответствии с возрастом, согласно общепринятой классификации возрастных периодов развития человека. В группе с ВМ дети представлены в 3-х возрастных подгруппах (2-6 лет, 6-12 лет, 12-18 лет), тогда как при БГМ в 4-х (3-12 месяцев, 1-2 года, 2-6 лет и 6-12 лет). Субпопуляционный состав лимфоцитов крови больных с ВМ и БГМ сравнивали с литературными данными нормы у детей разного возраста, включающими только основные субпопуляции [148].

**Биологический материал.** Кровь получали путём пункции периферической вены и собирали в вакуумные пробирки с добавлением Li-гепарина. ЦСЖ собирали в стерильные пластиковые пробирки без наполнителя при проведении в асептических условиях диагностической и контрольной люмбальной пункции (ЛП).

**Стандартные лабораторные исследования.** Гематологические исследования выполнены на анализаторе Sysmex XP-300 (Япония), в мазке крови осуществляли подсчёт лейкоцитарной формулы с использованием микроскопа АХЮ LAB.A1 (Германия). Биохимические исследования



выполнены на автоматических анализаторах COBAS с 501 (Roche, Франция) и Taurus (Instrumentation Laboratory, Италия).

Стандартное исследование ЦСЖ включало определение общего белка и цитоза с дифференциацией на моно- и полинуклеарные лейкоциты (реагенты Диахим-ЦСЖ, НПФ Абрис<sup>+</sup>, Санкт-Петербург, Россия). Характер плеоцитоза определялся по соотношению нейтрофилов и лимфоцитов: нейтрофильный при количестве нейтрофилов  $\geq 80\%$ , лимфоцитарный - при количестве лимфоцитов  $\geq 80\%$ . Во всех остальных случаях плеоцитоз характеризовался как смешанный.

**Иммунофенотипический анализ.** Иммунофенотипирование клеток крови и ЦСЖ осуществляли на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Beckton Dickenson, BD, США), оснащённым аргоновым лазером (длина волны 488 нм) и полупроводниковым лазером (длина волны 635 нм). Для оценки относительного содержания субпопуляций лимфоцитов в крови и ЦСЖ использованы тест-системы Beckton Dickenson (BD) MultiTEST IMK Kit (кат № 340503, США) с 4-х цветной панелью антител: CD3/CD8/CD45/CD4 и CD3/CD16+CD56/CD19, меченных флуорохромами FITC, PE, PerCP и APC. Пробоподготовка образцов крови осуществлялась согласно инструкции производителя.

Для исследования субпопуляций лимфоцитов ликвора проведена адаптация пробоподготовки с проверкой качества взвеси лимфоцитов. Ликвор, полученный при проведении ЛП, сразу после доставки в лабораторию и проведения стандартных исследований общего белка и цитоза с дифференциацией на моно- и полинуклеары, центрифугировали в течение 5 минут при 1800 об/мин на центрифуге Heraeus Labofuge 300 (Германия). Пипетированием аккуратно снимали надосадок. Осадок ресуспендировали в необходимом для иммунофенотипирования объёме надосадка (100 мкл), едином для всех образцов. Такая пробоподготовка позволяла минимизировать повреждение клеток ликвора. Иммунофенотипирование

лимфоцитов ликвора осуществляли в течение 1,5 часов после диагностической ЛП.

Для исследования субпопуляций крови и ликвора подготовленные образцы вносили в пробирки Falcon для цитометров BD: №1 и №2 для каждого образца. В пробирку №1 вносили 20 мкл. смеси антител CD3/CD8/CD45/CD4, в пробирку №2 20 мкл. смеси антител CD3/CD16+CD56/CD19. В каждую пробирку добавляли по 50 мкл взвеси лимфоцитов крови, либо ликвора, инкубировали 15 минут в темноте при комнатной температуре. Далее вносили 450 мкл разбавленного согласно инструкции лизирующего раствора, перемешивали с использованием ротационного перемешивателя Vortex V-1 plus и проводили исследование на проточном цитофлуориметре.

Для образцов крови и ликвора детей с менингитами регистрировали не менее 2000 одиночных событий (клеток) в гейте CD45<sup>+++</sup>, для ликвора детей с ОРВИ с менингизмом не менее 500 событий. Контролем качества методики являлась сумма субпопуляций лимфоцитов (Lymphosum) и разница CD3% в 2-х пробирках. Сумма лимфоцитов складывается из 3 основных популяций: Т-лимфоциты, В-лимфоциты и NK и должна быть не менее 95 единиц. Разница % CD3 в 1-й и 2-й пробирке не должна превышать 5 единиц.

Общее количество исследований субпопуляций лимфоцитов крови и ликвора составило 374 (табл. 4).

Таблица 4 - Количество исследований (фенотипирование лимфоцитов) в разные периоды вирусного серозного, бактериального гнойного менингита и детей группы сравнения.

| Процедура                  | Жидкость | Количество исследований (n) |                            |    |                                | Итого |     |
|----------------------------|----------|-----------------------------|----------------------------|----|--------------------------------|-------|-----|
|                            |          | Группа сравнения ОП         | Вирусный серозный менингит |    | Бактериальный гнойный менингит |       |     |
|                            |          |                             | ОП                         | ПР | ОП                             |       | ПР  |
| Фенотипирование лимфоцитов | Кровь    | 8                           | 62                         | 44 | 24                             | 26    | 164 |
|                            | Ликвор   | 27                          | 82                         | 41 | 32                             | 28    | 210 |
|                            | Всего    | 35                          | 144                        | 85 | 56                             | 54    | 374 |

Примечание: ОП - острый период заболевания, ПР - период реконвалесценции заболевания

*Аналитический этап.* Сбор и обработка данных осуществляется на стандартном программном обеспечении (MULTITEST, CellQuest, и др.),

предустановленном на цитометр, либо с помощью специализированных программ, таких как FlowJo (BD) и Kaluza (Beckman Coulter) работающих со всеми стандартными форматами цитометрических файлов по представленному ниже алгоритму.

**Алгоритм выделение основных и малых субпопуляций лимфоцитов (рис. 1).**

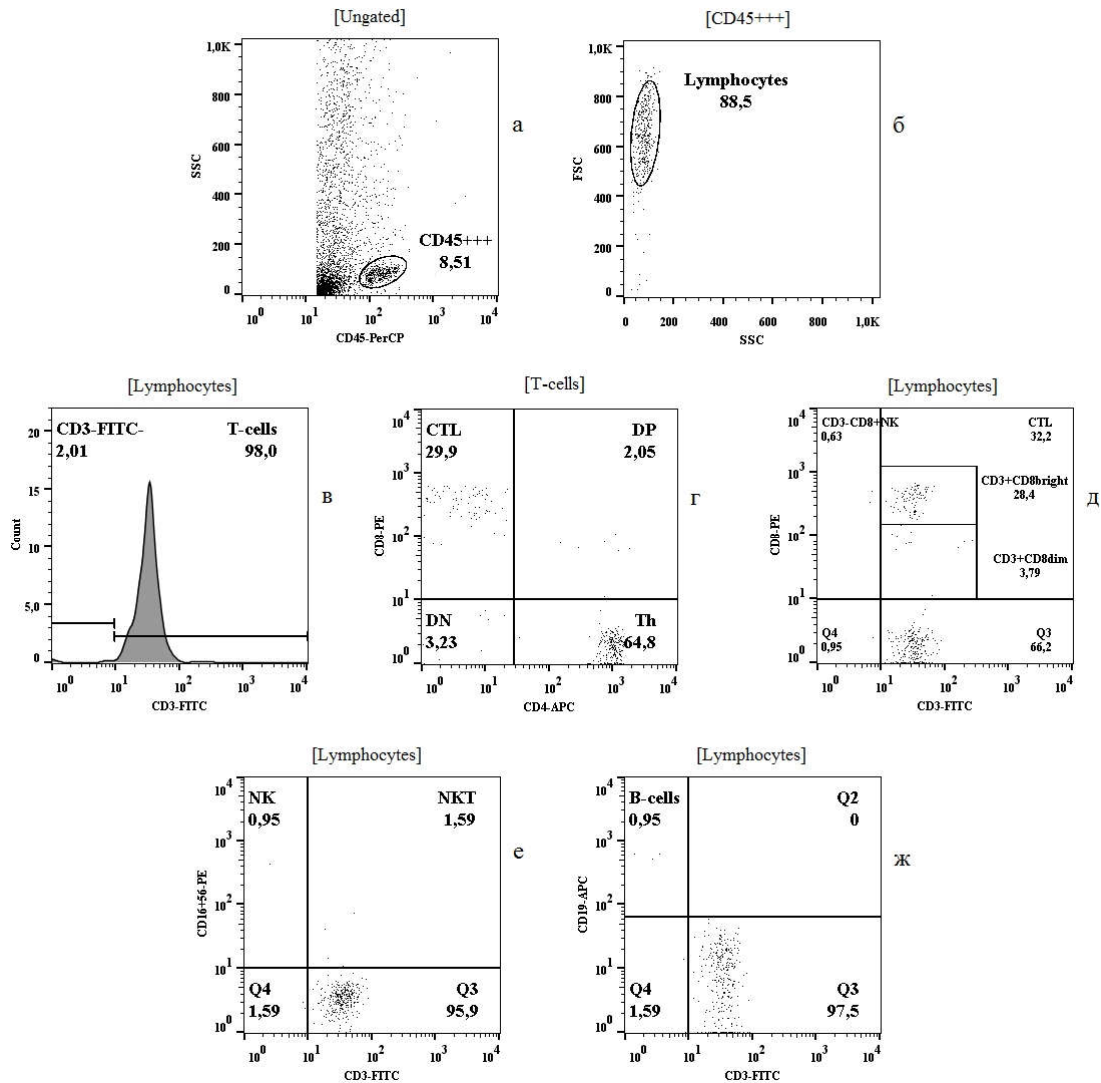


Рисунок 1. Тактика построения гейтов для выделения основных и малых субпопуляций лимфоцитов. Точечный график, а) по оси абсцисс – уровень экспрессии CD45, по оси ординат – боковое светорассеяния (SSC-H), характеризующий состояние цитоплазмы клеток. В области «CD45<sup>+++</sup>» находятся клетки с высокой экспрессией CD45 и низким уровнем бокового светорассеяния; точечный график б) по оси абсцисс – боковое светорассеяние (SSC-H), по оси ординат – прямое светорассеяние (FSC-H), характеризующее размер клеток, в области «Lymphocytes» находятся клетки, соответствующие по размерам и структуре популяции лимфоцитам. Описание следующих этапов выявления субпопуляций лимфоцитов в тексте.

На основе экспрессии CD45 и параметра бокового светорассеяния (SSC) выделяли область «CD45<sup>+++</sup>», соответствующую по структуре и размерам лимфоцитам (рис. 1а).

Далее на основе параметра бокового (SSC) и прямого (FSC) светорассеяния среди клеток области «CD45<sup>+++</sup>» обозначили область «Lymphocytes», соответствующую одиночным клеткам (рис. 1б). Этой процедурой отсекаются распавшиеся (дебрис). Гейт Lymphocytes (рис. 1б) принимали за 100% лимфоцитов. Для нивелирования разницы в сумме лимфоцитов в разных пробирках рассчитывали среднее значение в каждой пробирке. Относительное значение основных и малых субпопуляций лимфоцитов рассчитывалось как пропорция всех лимфоцитов, так и пропорция CD3<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup> - гейта, каждый из которых принимали за 100%.

В рамках популяции «Lymphocytes» выделяли CD3<sup>+</sup> T-cells (правый пик гистограммы на рис. 1в) и CD3<sup>-</sup> лимфоциты (левый пик гистограммы на рис. 1в). Среди «T-cells» на основе экспрессии CD4 и CD8 выделяли Th (правый нижний квадрант, рис. 1г), CTL (верхний левый квадрант, рис. 1г), DP (правый верхний квадрант, рис. 1г) и DN (левый нижний квадрант, рис. 1г). Для разделения субпопуляции, экспрессирующих CD8 использовали маркеры CD3 и CD8: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup> (правый верхний квадрант) и CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> NK (левый верхний квадрант) (рис. 1д). Субпопуляции NK (левый верхний квадрант) и NKT (правый верхний квадрант) выделяли на основе экспрессии CD3 и CD16+56 (рис. 1е). В-клетки выделяли на основе экспрессии CD19 (левый верхний квадрант, рис. 1ж).

**Статистический анализ.** Получение и обработка данных осуществлялась с помощью специализированных программ MultiSET (BD, США), CellQuest (BD, США) и FlowJo. Первичная сортировка, накопление и хранения данных исследования проводились на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2013. Статистический анализ данных проводился с помощью программы GraphPad Prism 5.0. Для проверки характера распределения данных в выборке

использовали критерий Колмогорова. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха каждой выборки  $Me [Q_{25} - Q_{75}]$ . Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический U критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Для подчиняющихся нормальному распределению использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Показатели в динамике оценивались с применением парного критерия Вилкоксона и парного t-критерия Стьюдента, в зависимости от характера распределения признаков в выборке. Проведён анализ непараметрической ранговой корреляции Спирмена субпопуляционного состава лимфоцитов крови с показателями клинического анализа крови и уровнем СРБ, как основных маркеров выраженности системного воспаления, ССЛ ликвора – с показателями плеоцитоза и общего белка ликвора. Оценивали коэффициент корреляции  $r$ , который считался достоверным при уровне значимости  $p < 0,05$ . Для оценки эффективности применения субпопуляций лимфоцитов в качестве маркеров дифференциальной диагностики и оценки степени тяжести менингита использовали ROC-анализ с оценкой чувствительности, специфичности и показателя «площадь под ROC-кривой» (AUC).

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Клинико-лабораторная характеристика детей с менингитом

Анализ возрастной структуры показал, что возраст детей в группе с ВМ колебался в диапазоне от 0,3 до 17,3 лет, 9,5 (Me), в группе с БГМ от 0,25 до 15 лет, 2,9 (Me), в группе сравнения от 2,4 до 17,8 лет, 8 лет по медиане. Дети ОРВИ с менингизмом и ВМ не различались по возрасту, тогда как дети с БГМ достоверно младше детей как контрольной группы, так и с ВМ. При ВМ дети от 2-6 лет составили 27%, от 6-12 лет - 42% и 12-18 лет - 30%, а также 1 ребёнок был в возрасте до года. При БГМ дети до года составили 23%, 1-2 года - 10%, от 2-6 лет - 46 % и от 6 -12 лет - 21% (рис. 2).

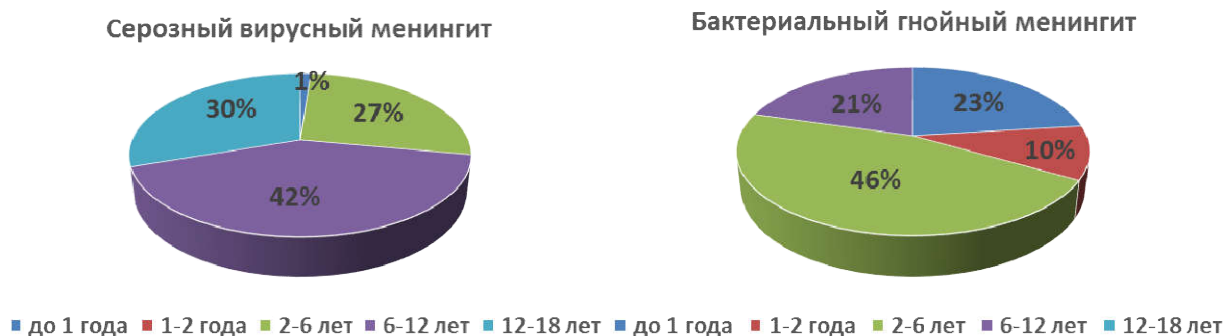


Рисунок 2. Возрастная структура детей с вирусным серозным и бактериальным гнойным менингитом.

В ходе проведённого исследования установлено, что в этиологической структуре ВМ преобладали энтеровирусы (ЭВ) – 53,5% (n=46), у 1,2% (n=1) пациента причиной развития ВМ стал цитомегаловирус и у 45,3% (n=39) человек этиология ВМ не установлена. Среди больных БГМ у 61% (n=24) установлен менингококковый менингит (ММ, возбудитель *Neisseria meningitidis*), у 7 (18%) – гемофильный менингит (ГМ, возбудитель *Haemophilus influenzae*), у 7 (18%) – пневмококковый менингит (ПМ, возбудитель *Streptococcus pneumoniae*), у 1 (3%) человека этиология возбудителя не установлена. В группе сравнения у 2 детей выявлен ЭВ

(7,4%), у 1 - ЭВ и риновирус (3,7%) и у 24 (88,9%) этиология возбудителя не установлена.

Степень тяжести заболевания оценивалась в день проведения диагностической люмбальной пункции и взятия образцов периферической крови (рис. 3).

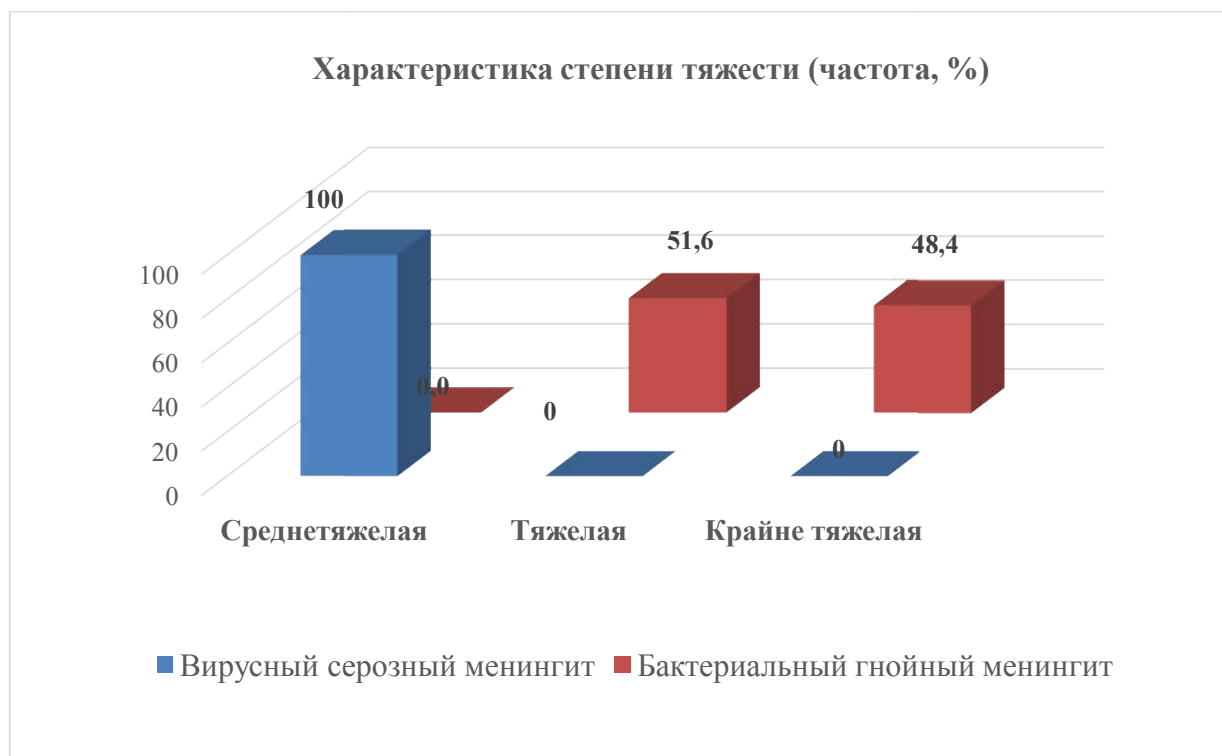


Рисунок 3. Характеристика степени тяжести вирусного серозного и бактериального гнойного менингита.

Степень тяжести всех пациентов с ВМ характеризовалась как среднетяжёлая (100% случаев) [13] (рис. 3). При БГМ степень тяжести на день исследования оценивалась по 4 критериям: нахождение ребёнка на искусственной вентиляции лёгких, наличие синдрома полиорганной недостаточности, выраженное системное воспаление (уровень СРБ>50 мг/л, лейкоцитоз или лейкопения, белок в ЦСЖ>1 г/л). При наличии менее 2-х критериев – степень тяжести характеризовалась как тяжёлая (51,6%, n=16), 2 и более – крайне тяжёлая (48,4% случаев, n=15) (рис. 3).

Исследование клинического анализа крови выявило, что в острую стадию ВМ большинство показателей не отличались от группы сравнения, за исключением повышенных тромбоцитов (табл. 5).

Таблица 5 - Показатели стандартного анализа крови детей с вирусным серозным, бактериальным гнойным менингитом и группы сравнения.

| Показатели                      | Содержание. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ]. |                            |                                |                                 |                                   |
|---------------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
|                                 | Группа сравнения (n=9)                               | Серозный вирусный менингит |                                | Бактериальный гнойный менингит  |                                   |
|                                 |  | Острая стадия (n=86)       | Фаза реконвалесценция (n=45)   | Острая стадия (n=36)            | Фаза реконвалесценция (n=31)      |
| Группы (n)                      |  |                            |                                |                                 |                                   |
| Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л   | 10,0<br>[7,4 - 14,3]                                 | 10,6<br>[8,2 - 13,2]       | 6,9 *, **<br>[6,0 - 8,3]       | 14,4 *, ***,<br>[11,6 - 21,3]   | 12,1 **, ***,<br>[8,0 - 15,2]     |
| Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л | 4,6<br>[4,5 - 4,8]                                   | 4,7<br>[4,4 - 5,0]         | 4,8 *<br>[4,6 - 5,1]           | 3,9 *, ***,<br>[3,6 - 4,2]      | 3,7 *, ***,<br>[3,3 - 4,1]        |
| Гемоглобин, (г/л)               | 132,5<br>[122,5 - 140,0]                             | 133<br>[123 - 140]         | 134,0<br>[125,0 - 141,3]       | 106 *, ***,<br>[91,0 - 113,3]   | 101,0 *, ***,<br>[89,3 - 114,3]   |
| Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л  | 238,5<br>[218,5 - 298,8]                             | 292,5 *<br>[234,5 - 340,3] | 333,0 *, **<br>[269,8 - 375,0] | 180,5 *, ***,<br>[81,8 - 284,5] | 392 *, **, ***,<br>[285 - 635]    |
| Лимфоциты, (%)                  | 15,2<br>[7,9 - 30,4]                                 | 17,1<br>[11,1 - 26,0]      | 38,9 *, **<br>[32,2 - 47,1]    | 12,4<br>[6,0 - 22,3]            | 39,6 *, **<br>[27,7 - 45,7]       |
| Лимфоциты, (абс.)               | 1,5<br>[1,0 - 2,1]                                   | 1,7<br>[1,2 - 2,3]         | 2,7 *, **<br>[2,1 - 3,3]       | 1,7<br>[1,4 - 2,7]              | 3,6 *, **, ***,<br>[2,7 - 5,8]    |
| Нейтрофилы, (%)                 | 77,9<br>[58,4 - 84,9]                                | 77,0<br>[64,0 - 82,5]      | 50,9 *, **<br>[40,9 - 58,6]    | 84,0 ***,<br>[74,6 - 91,0]      | 58,5 *, **, ***,<br>[49,5 - 66,0] |
| Нейтрофилы, (абс.)              | 8,5<br>[4,0 - 12,9]                                  | 8,3<br>[5,8 - 10,5]        | 3,4 *, **<br>[2,5 - 4,6]       | 10,9 *, ***,<br>[8,0 - 18,8]    | 6,3 **, ***,<br>[3,9 - 9,3]       |

Примечание: \* - отличия от группы сравнения, \*\* - отличия от острого периода \*\*\* - отличие ВМ от БГМ

В период ранней реконвалесценции ВМ наблюдались существенные изменения большинства показателей в сравнении с острым периодом. Так, снижалось общее количество лейкоцитов, относительное и абсолютное содержание нейтрофилов. Напротив, уровень тромбоцитов, эритроцитов, относительное и абсолютное содержание лимфоцитов увеличивалось в динамике заболевания.

В острую фазу БГМ при сопоставлении с группой сравнения выявлено увеличение содержания общих лейкоцитов и абсолютного содержания нейтрофилов, тогда как показатели гемоглобина, тромбоцитов были ниже. В динамике БГМ зафиксировано снижение содержания лейкоцитов, абсолютного и относительного содержания нейтрофилов, а также увеличение лимфоцитов (абсолютного и относительного количества) и тромбоцитов.

Сравнение клинического анализа крови при менингитах показало, что в остром периоде БГМ относительно ВМ увеличено содержание лейкоцитов, нейтрофилов (относительного и абсолютного), тогда как содержание эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, тромбоцитов снижено. В период реконвалесценции при БГМ в сравнении с ВМ выше содержание лейкоцитов,



тромбоцитов, абсолютное количество лимфоцитов и ниже содержание эритроцитов, гемоглобина.

Анализ выборки показал, что у 98% детей при ВМ и 71% детей при БГМ общее количество лейкоцитов в крови находилось в диапазоне от 4 до  $20 \cdot 10^9$  кл/л (рис. 4).

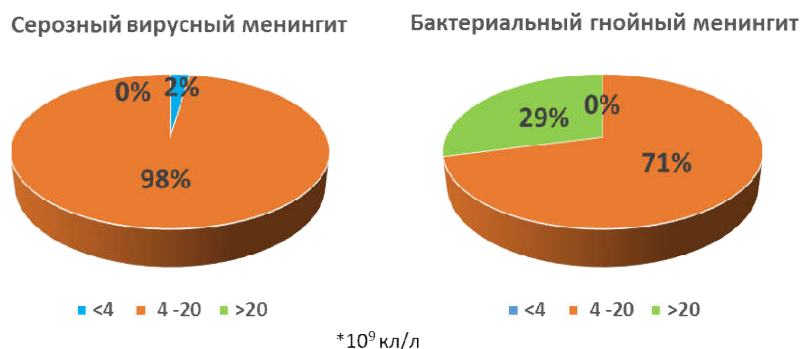


Рисунок 4. Частота встречаемости показателя содержания общих лейкоцитов в крови у детей с серозным вирусным и бактериальным гнойным менингитов в различных диапазонах.

Относительное содержание нейтрофилов и лимфоцитов в крови детей с ВМ и БГМ пересекается в широком диапазоне. Так, у 100% детей с ВМ и БГМ относительное содержание нейтрофилов в крови находилось в диапазоне от 37 до 95%. Относительное содержание лимфоцитов в крови у 100% детей с ВМ и 89% детей с БГМ располагалось в диапазоне от 4 до 50%. Расчёт частоты показал, что лимфопения при ВМ обнаружена у 58%, тогда как лимфоцитоз у 10% обследованных детей. При БГМ лимфопения встречается у 79% и лимфоцитоз у 4% обследованных детей (рис. 5).

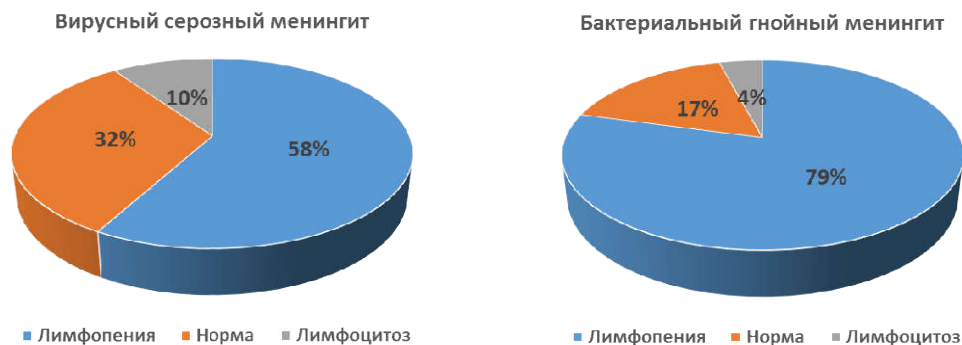


Рисунок 5. Частота встречаемости лимфопении, лимфоцитоза и нормальных значений содержания лимфоцитов в крови у детей с серозным вирусным и бактериальным гнойным менингитом.

Анализ биохимических показателей выявил снижение мочевины и повышение креатинина и билирубина в сыворотке детей в остром периоде и в периоде реконвалесценции ВМ в сравнении с ОРВИ (табл. 6).

Таблица 6 - Биохимические показатели сыворотки крови у детей с вирусным серозным, бактериальным гнойным менингитом и острой респираторной вирусной инфекцией

| Показатели                            | Содержание. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ]. |                            |                       |                                |                               |
|---------------------------------------|--|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                                       | ОРВИ<br>Острая                                       | Вирусный серозный менингит |                       | Бактериальный гнойный менингит |                               |
|                                       |  | Острая                     | Реконвалесценция      | Острая                         | Реконвалесценция              |
| АЛТ (ед/л)<br>(0,0 - 41,0)            | 14<br>[12 - 17]                                      | 13<br>[11 - 16]            | 15<br>[11 - 18]       | 15<br>[11 - 20]                | 21<br>[10,5 - 27,5]           |
| АСТ (ед/л)<br>(0,0 - 40,0)            | 38<br>[23 - 44]                                      | 23<br>[15 - 26]            | 22<br>[19 - 25]       | 24<br>[16 - 33]                | 26<br>[20 - 33]               |
| Мочевина (ммоль/л)<br>(2,78 - 8,07)   | 5,1<br>[5,0 - 6,2]                                   | 4,0 *<br>[3,4 - 4,8]       | 4,0<br>[3,1 - 5,0]    | 5,2 ***<br>[3,9 - 6,5]         | 3,4 **<br>[2,8 - 5,0]         |
| Креатинин (мкмоль/л)<br>(21,0 - 42,0) | 32<br>[21 - 53]                                      | 57,2 *<br>[47,9 - 63,6]    | 53,3<br>[45,7 - 62,2] | 44 ***<br>[35 - 51]            | 34,8 **, ***<br>[23,5 - 43,0] |
| Глюкоза (ммоль/л)<br>(3,5 - 5,8)      | 5,0<br>[2,8 - 5,3]                                   | 4,6<br>[4,2 - 5,3]         | 4,7<br>[4,4 - 5,0]    | 8,3 *, ***<br>[6,1 - 10,5]     | 5,4 **, ***<br>[4,5 - 6,1]    |
| СРБ (мг/л)<br>(0,0 - 5,0)             | 12,6<br>[2,5 - 20,5]                                 | 9,1<br>[2,6 - 43,5]        | 4,65                  | 150 *, ***<br>[119 - 198]      | 9,6 **<br>[4,8 - 38,0]        |
| Билирубин (мкмоль/л)<br>(3,4 - 20,5)  | 4,9<br>[3,7 - 6,1]                                   | 10,8 *<br>[6,6 - 14,3]     | 9,8 *<br>[7,3 - 12,9] | 4,7 ***<br>[3,2 - 5,4]         | 3,7 ***<br>[3,2 - 6,5]        |
| Белок общий (г/л)<br>(46,0 - 75,0)    | 65<br>[61 - 69]                                      | 72<br>[66 - 76]            | 69<br>[66 - 74]       | 58 ***<br>[54 - 62]            | 60 ***<br>[59 - 66]           |

Примечание: \* - отличия от группы сравнения, \*\* - отличия от острого периода \*\*\* - отличие ВМ от БГМ

В остром периоде БГМ в сравнении с ОРВИ выше содержание глюкозы и значительно повышена концентрация С-реактивного белка (СРБ). К периоду реконвалесценции БГМ относительно острого периода наблюдается снижение содержания мочевины, креатинина, глюкозы и СРБ. Сравнение биохимических показателей при менингитах показало, что при БГМ в сыворотке крови в сравнении с ВМ выше содержание мочевины, глюкозы и СРБ, тогда как содержание креатинина и билирубина ниже. В период реконвалесценции в крови детей с БГМ в сравнении с ВМ выше содержание глюкозы и СРБ, ниже содержание креатинина, билирубина и общего белка (табл. 6). Выявленные различия биохимических показателей при ВМ и БГМ могут свидетельствовать о характерных поражениях внутренних органов при вирусной и бактериальной инфекции.

В клинической лабораторной диагностике принято считать значения СРБ ниже 50 мг/л характерными для вирусных инфекций, а превышающие 50 мг/л – для бактериальных. Однако, анализ выборки при менингитах показал,

что у детей с ВМ СРБ в 22% случаев превышал 50 мг/л, достигая в крайних случаях 229 мг/л, тогда как при БГМ в 17% случаев значения были ниже 50 мг/л (рис. 6).

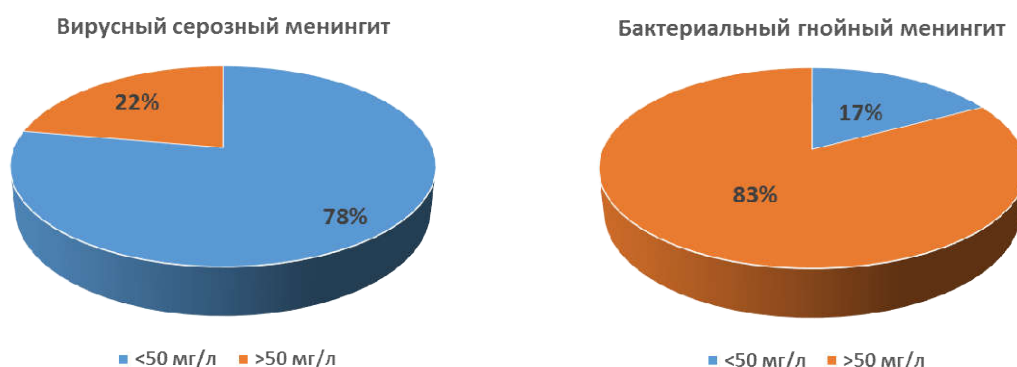


Рисунок 6. Частота встречаемости концентрации С-реактивного белка в диапазонах до 50 мг/л и свыше 50 мг/л в сыворотке крови у детей с серозным вирусным и бактериальным гнойным менингитом

Результаты стандартного анализа ЦСЖ детей при ОРВИ не выявили отклонений от общепринятых возрастных норм [23], что позволило исключить наличие менингита (табл. 7). При ВМ и БГМ количество общего белка, цитоз, содержание нейтрофилов и мононуклеаров в ликворе было достоверно выше в обе стадии заболевания при сопоставлении с группой сравнения.

При БГМ в сравнении с ВМ в острую фазу заболевания выше значения всех исследованных параметров ликвора (табл. 7).

Таблица 7 - Показатели стандартного анализа ликвора детей с острой респираторной вирусной инфекцией, вирусным серозным и гнойным менингитом в динамике заболевания.

| Показатели     | Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ]. |                            |                              |                                   |                                  |
|----------------|--|----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|                | Группа сравнения (n=27)                  | Вирусный серозный менингит |                              | Бактериальный гнойный менингит    |                                  |
|                |  | Острая стадия (n=86)       | Фаза Реконвалесценция (n=73) | Острая Стадия (n=36)              | Фаза Реконвалесценция (n=31)     |
| Белок (г/л)    | 0,2<br>[0,1 - 0,3]                       | 0,5 *<br>[0,3 - 0,7]       | 0,3 *, **<br>[0,2 - 0,4]     | 0,87 *, ***<br>[0,52 - 1,33]      | 0,37 *, **<br>[0,27 - 0,68]      |
| Цитоз (кл/мкл) | 2,0<br>[1,3 - 3,2]                       | 190,7 *<br>[68,3 - 422,2]  | 15,7 *, **<br>[8,7 - 26,3]   | 1803,0 *, ***<br>[777,2 - 4329,0] | 31,0 *, **, ***<br>[13,3 - 57,3] |
| Ne (кл/мкл)    | 0,3<br>[0,0 - 1,0]                       | 39,2 *<br>[14,1 - 134,7]   | 1,0 *, **<br>[0,3 - 2,2]     | 1491 *, ***<br>[437 - 3973]       | 5,7 *, **, ***<br>[2,5 - 11,4]   |
| Мо (кл/мкл)    | 1,7<br>[1,0 - 2,0]                       | 96,5 *<br>[40,5 - 281,5]   | 12,5 *, **<br>[7,8 - 23,8]   | 293 *, ***<br>[101 - 544]         | 19,7 *, **, ***<br>[9,6 - 45,1]  |

Примечание: \* - отличия от группы сравнения, \*\* - отличия от острого периода. \*\*\* - отличия ВМ от БГМ в разные стадии заболевания. Ne – нейтрофилы, Мо – моноциты.

В динамике менингитов наблюдается тенденция к снижению всех показателей в ликворе, однако они остаются достоверно выше значений группы сравнения. При этом в период реконвалесценции при БГМ в сравнении с ВМ цитоз, содержание нейтрофилов и мононуклеаров остаётся выше, тогда как уровни общего белка в ликворе становятся сопоставимыми (табл. 7).

При ВМ в 55% случаев выявлен лимфоцитарный плеоцитоз ликвора, при БГМ в 63% - нейтрофильный (рис. 7).

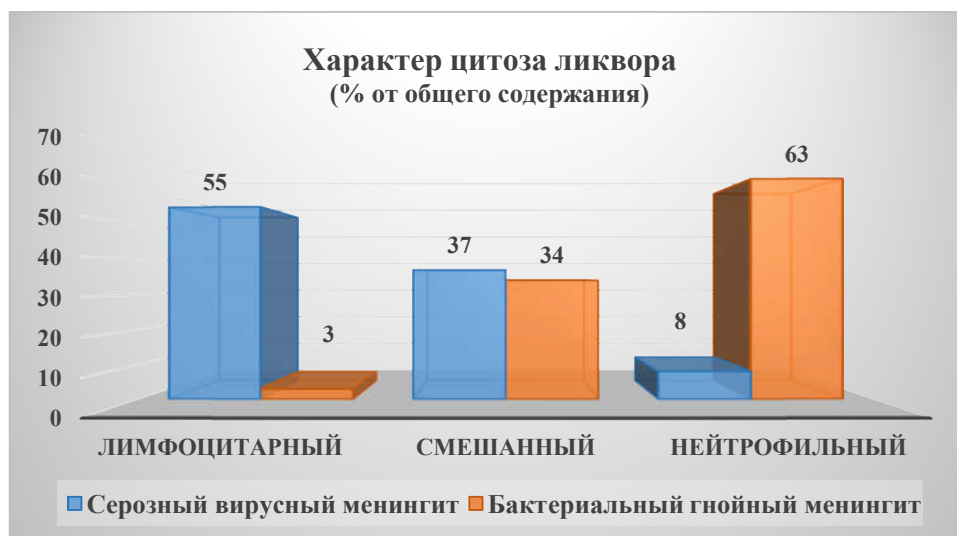


Рисунок 7. Частота встречаемости различных видов плеоцитоза при вирусных и бактериальных менингитах (в % от общего количества).

В 37% случаев при вирусном и 34% при бактериальном гнойном менингите наблюдается смешанный плеоцитоз, часто с преобладанием не характерных для данных нозологических форм клеточных популяций. Так, в 39% случаев смешанного плеоцитоза ликвора при ВМ выявлено равное или большее содержание нейтрофилов в сравнении с моноцитами. При БГМ у пациентов со смешанным плеоцитозом ЦСЖ в 33,5% случаев преобладали мононуклеары. Отдельно стоит отметить, что у 8% пациентов с диагнозом серозный менингит в ликворе выявлен нейтрофильный плеоцитоз, а у 3% с диагнозом БГМ – лимфоцитарный (рис. 7).

Этиологический диагноз был верифицирован с применением бактериологических и серологических методов лабораторной диагностики.

При исследовании ЦСЖ детей с установленным возбудителем менингита показатели общего белка и цитоза, как и в целом по группам, были выше у пациентов с БГМ по сравнению с ВМ, однако, было отмечено перекрытие показателей в широком диапазоне. Так, минимальное значение цитоза при БГМ составляло 66 кл/мкл, при ВМ значения могли достигать 1592 кл/мкл (табл. 8).

Таблица 8 - Чувствительность и специфичность стандартных показателей ликвора пациентов с вирусным и бактериальным менингитом в остром периоде заболевания.

| Показатели ликвора | Me [Min - Max]           |                               | AUC  | Cutoff | Specificity % | Sensitivity % |
|--------------------|--------------------------|-------------------------------|------|--------|---------------|---------------|
|                    | Вирусный менингит (n=44) | Бактериальный менингит (n=33) |      |        |               |               |
| Общий белок (г/л)  | 0,52<br>[0,18 - 1,088]   | 0,88<br>[0,13 - 3,13]         | 0,76 | >0,75  | 66,7          | 86,4          |
| Цитоз (кл/мкл)     | 209,3<br>[14,0 - 1592]   | 1877,0<br>[66,0 - 15787,0]    | 0,90 | >501,2 | 87,9          | 75,0          |
| Ne (кл/мкл)        | 44,0<br>[1,0 - 784,0]    | 1521,0<br>[9,3 - 14507]       | 0,94 | >170,0 | 90,6          | 84,1          |
| Mo (кл/мкл)        | 120,2<br>[10,7 - 1275]   | 298,7<br>[13,3 - 2901]        | 0,66 | >198,7 | 62,5          | 61,4          |

Примечание: все представленные показатели в сравниваемых группах достоверно различаются. Ne – нейтрофилы, Mo – моноциты, AUC – площадь под кривой, Cutoff – отсечка, Specificity – специфичность, Sensitivity – чувствительность.

Таким образом, выявлены широкие области перекрытия стандартных лабораторных показателей крови и ликвора при ВМ и БГМ, что не позволяет их использование с целью дифференциальной диагностики вирусной или бактериальной природы заболевания.

### 3.2. Субпопуляционный состав лимфоцитов ликвора у детей группы сравнения

Анализ относительного содержания в ЦСЖ основных субпопуляций выявил доминирование Т-лимфоцитов и субпопуляции Th над CTL, а также малое количество НК и В-лимфоцитов (табл. 9).

Таблица 9 - Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов крови и ликвора детей с острой респираторной вирусной инфекцией, протекающей с синдромом менингизма.

| Относительное содержание. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] (%) |                    |
|---|--------------------|
| Субпопуляции лимфоцитов   | Ликвор (n=27)      |
| T-cells   | 95,2 [94,3 - 97,6] |
| Th  | 53,4 [47,0 - 61,6] |
| CTL   | 28,2 [20,1 - 34,8] |
| NK  | 2,2 [1,0 - 3,1]    |
| B-cells   | 0,7 [0,2 - 1,7]    |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> NK                                  | 0,3 [0,0 - 1,2]    |
| NKT   | 9,3 [5,9 - 16,9]   |
| DN  | 5,3 [2,4 - 8,2]    |
| DP  | 4,0 [2,8 - 7,9]    |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>                                    | 23,8 [16,0 - 33,6] |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>                                   | 7,3 [5,1 - 12,9]   |
| Th/CTL  | 2,0 [1,5 - 2,6]    |

Среди субпопуляций CTL CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup> превалировали над Т-клетками, экспрессирующими CD8 с низкой интенсивностью - CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup> (табл. 9). Так, число NKT клеток в среднем составляло 9%, DN Т-лимфоцитов - 5,3%, а DP Т-лимфоцитов - 4,0%. Полученные результаты свидетельствуют о значимой роли малых субпопуляций NKT, DN и DP Т-клеток для поддержания интрацеллюлярного иммунного гомеостаза в условиях ОРВИ у детей.

Выявлен значительный разброс относительного содержания всех исследованных субпопуляций. Так, доля Th колебалась в широком диапазоне от 22,9% (min) до 86,1% (max) от числа всех лимфоцитов, а CTL от 11,1% (min) до 67,8% (max). При расчёте индивидуального коэффициента соотношения Th/CTL (CD4/CD8) установлено, что в абсолютном большинстве случаев в ЦСЖ превалировали Th, и только в 2 случаях (7,4%) CTL преобладали над Th. Среди исследованных образцов ЦСЖ в двух

случаях выявлено увеличение содержания НК и В-клеток (в сумме выше 10%) с соответствующим снижением числа Т-лимфоцитов (<90%). Дисперсия содержания большинства исследованных субпопуляций лимфоцитов ЦСЖ у детей обследованной группы может отражать возрастные особенности функционирования иммунной системы мозга.

В связи с этим был проведён корреляционный анализ показателей относительного содержания субпопуляций лимфоцитов с возрастом пациентов. Обнаружена достоверная положительная корреляция между возрастом и относительным содержанием в ЦСЖ общих Т-клеток, Th и коэффициентом Th/CTL(CD4/CD8) ( $r=0,44$ ,  $r=0,62$ ,  $r=0,53$ , соответственно,  $p<0,05$ ), тогда как с относительным содержанием CTL, DN и NK выявлена отрицательная связь ( $r= -0,45$ ,  $r= -0,63$ ,  $r= -0,51$ , соответственно,  $p<0,05$ ) (рис. 8).

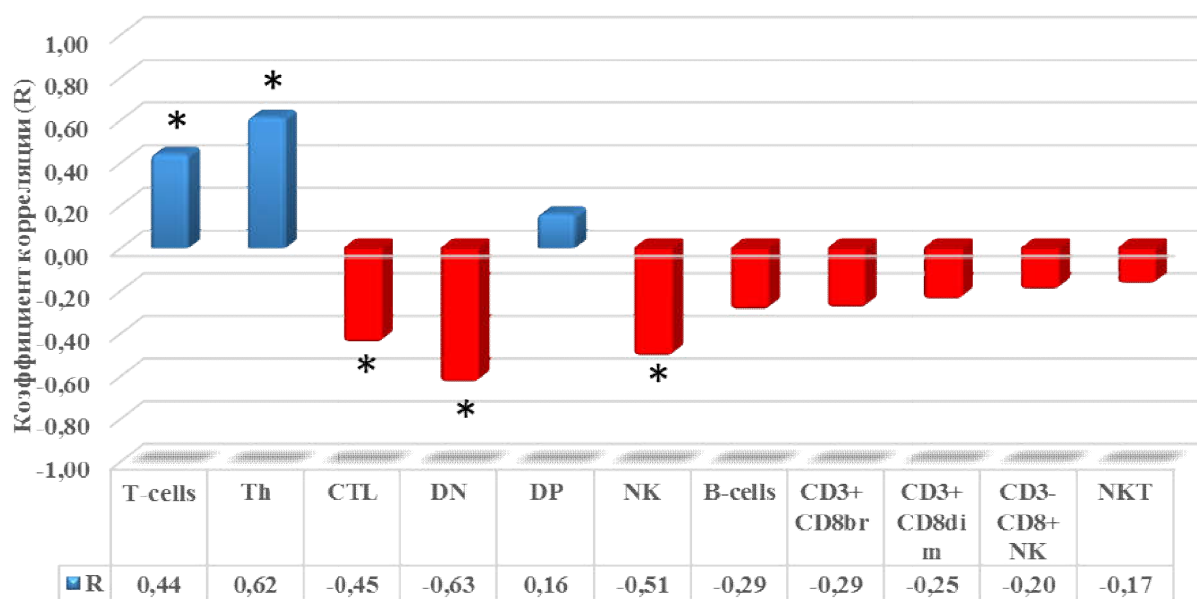


Рисунок 8. Корреляция субпопуляций лимфоцитов ликвора с возрастом (\* -  $p<0,05$ ).

Результаты корреляционного анализа явились основанием для разделения детей на 3 группы по возрасту согласно общепринятой классификации возрастных периодов развития человека (табл. 10).

Таблица 10 - Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов ликвора детей с острой респираторной вирусной инфекцией с синдромом менингизма в зависимости от возраста.

| Субпопуляции лимфоцитов              | Относительное содержание %. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] |                            |                              |
|--------------------------------------|---|----------------------------|------------------------------|
|                                      | 1 группа (2-6 лет)<br>n=7   | 2 группа (6-12 лет)<br>n=8 | 3 группа (12-18 лет)<br>n=12 |
| T-cells                              | 95,5 [90,5 - 96,3]  | 95,1 [92,7 - 96,3]         | 97,2 [94,8 - 98,2]           |
| Th                                   | 51,8 [40,2 - 53,1]  | 51,1 [40,8 - 57,9]         | 61,4 [53,8 - 73,0] *,**      |
| CTL                                  | 33,6 [25,8 - 36,3]  | 31,8 [24,8 - 36,1]         | 24,3 [14,8 - 30,2]           |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>   | 20,8 [12,3 - 27,9]  | 30,0 [22,8 - 42,0] *       | 23,8 [15,3 - 33,6]           |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>  | 12,4 [9,0 - 13,6]   | 7,1 [4,8 - 8,9]*           | 7,1 [4,3 - 14,9]             |
| DN                                   | 10,7 [8,8 - 14,6]   | 5,4 [4,7 - 7,0] *          | 3,0 [1,6 - 5,4] *            |
| DP                                   | 2,8 [1,9 - 4,0]   | 6,1 [3,6 - 10,8]           | 3,8 [3,1 - 9,1]              |
| NKT                                  | 11,9 [7,7 - 16,3]   | 7,2 [5,6 - 14,6]           | 8,9 [3,0 - 19,6]             |
| NK                                   | 3,1 [2,2 - 6,8]   | 2,9 [0,6 - 3,2]            | 1,5 [1,0 - 2,1] *            |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> NK | 1,1 [0,2 - 1,3]   | 0,3 [0,0 - 1,0]            | 0,5 [0,0 - 1,0]              |
| B-cells                              | 1,0 [0,5 - 1,7]   | 1,0 [0,3 - 4,1]            | 0,46 [0,06 - 1,61]           |
| Th/CTL                               | 1,46 [1,04 - 2,23]  | 1,51 [1,18 - 2,33]         | 2,45 [1,75 - 5,01] *         |

Примечание: \* - отличие от показателей 1-й группы, \*\* - отличие от показателей 2-й группы.

Полученные результаты показали рост субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup> и тенденцию к росту субпопуляции DP Т-лимфоцитов (p=0,054), при, напротив, снижении содержания CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup> и DN Т-лимфоцитов у детей раннего школьного возраста (6-12 лет, 2-я группа) в сравнении с детьми дошкольного возраста (2-6 лет, 1-я группа). Анализ показателей у детей подросткового возраста (12-18 лет, 3-я группа) выявил тенденцию к повышенному содержанию в ЦСЖ общих Т-лимфоцитов (p=0,06) и Th (p<0,05) в сравнении с детьми 1-й и 2-й групп. Доля CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup> у подростков оказалась сопоставима с показателями в 1-й группе и заметно снижена в сравнении со 2-й (p=0,068). Соотношение Th/CTL у детей 3-й группы выше, чем у детей 1-й группы (p<0,05) и, возможно, 2-й (p=0,08). Кроме того, в ЦСЖ детей 3-й группы достоверно ниже содержание NK и DN Т-лимфоцитов в сравнении с детьми 1-й, а DN, по-видимому, и с детьми 2-й группы (p=0,059).

При ОРВИ выявлена прямая корреляция общих лейкоцитов в крови с относительным содержанием В-клеток (r=0,65, p=0,08), Т-клеток, Th и коэффициента Th/CTL с количеством палочкоядерных нейтрофилов (r=0,73, r=0,73, r=0,78 p<0,05, соответственно) и СРБ с коэффициентом Th/CTL (r=0,79 p<0,05). Взаимосвязи уровня цитоза с относительным содержанием субпопуляций лимфоцитов в ликворе не обнаружено.



Таким образом, выявлены возрастные изменения содержания лимфоцитов в ЦСЖ, которые, по всей видимости, носят физиологический характер и связаны с созреванием иммунной системы. Полученные результаты характеризуют особенности лимфоцитарного пула ЦСЖ у детей без воспалительного процесса в ЦНС (белок и цитоз ликвора в пределах нормальных значений). Вследствие выявленных возрастных особенностей содержания ряда субпопуляций данные могут быть использованы в качестве контроля при изучении иммунопатогенеза инфекционных заболеваний ЦНС у детей разных возрастных групп.

### 3.3. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора при менингитах у детей

#### 3.3.1. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора при вирусном серозном менингите у детей

Исследование ССЛ крови и ликвора детей при ВМ выявил различные отклонения от группы сравнения, на разных стадиях заболевания (табл. 11).

Таблица 11 - Относительное содержание основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ликвора у детей с вирусным серозным менингитом и группы сравнения.

| Содержание (%). Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] |                       |                            |                          |                       |                            |                          |
|---|-----------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|
| Популяции лимфоцитов                                    | КРОВЬ                 |                            |                          | ЛИКВОР                |                            |                          |
|   | Группа сравнения      | Вирусный серозный менингит |                          | Группа сравнения      | Вирусный серозный менингит |                          |
|   |                       | (n=8)                      | О.П. (n=62)              |                       | П.Р. (n=44)                | (n=27)                   |
| T-cells   | 72,4<br>[67,1 - 77,7] | 68,8<br>[59,7 - 74,1]      | 71,1 **<br>[67,6 - 74,8] | 95,2<br>[94,3 - 97,6] | 95,7<br>[93,4 - 96,9]      | 94,8 **<br>[91,3 - 96,7] |
| Th  | 45,6<br>[36,6 - 52,9] | 35,5 *<br>[31,9 - 42,2]    | 39,3 **<br>[34,8 - 43,8] | 53,4<br>[47,0 - 61,6] | 66,9 *<br>[59,6 - 71,3]    | 53,5 **<br>[42,6 - 65,9] |
| CTL   | 22,7<br>[21,3 - 24,5] | 24,4<br>[20,7 - 28,1]      | 26,2 **<br>[21,5 - 28,5] | 28,2<br>[20,1 - 34,8] | 17,1 *<br>[13,8 - 22,5]    | 25,3 **<br>[19,2 - 29,7] |
| NK  | 6,8<br>[2,4 - 10,5]   | 9,1<br>[5,4 - 15,4]        | 10,1<br>[6,1 - 12,7]     | 2,2<br>[1,0 - 3,1]    | 3,3 *<br>[1,7 - 5,2]       | 2,7<br>[1,7 - 4,7]       |
| B-cells   | 17,6<br>[13,8 - 20,3] | 20,1<br>[16,0 - 22,8]      | 16,0 **<br>[13,8 - 19,3] | 0,7<br>[0,2 - 1,7]    | 0,4<br>[0,2 - 1,2]         | 1,2 *,**<br>[0,6 - 3,1]  |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> NK                    | 2,6<br>[1,2 - 3,6]    | 2,8<br>[2,0 - 6,5]         | 3,6<br>[2,1 - 5,8]       | 0,3<br>[0,0 - 1,2]    | 0,6<br>[0,3 - 1,0]         | 0,7 *<br>[0,4 - 1,2]     |
| NKT   | 0,9<br>[0,5 - 2,7]    | 2,5 *<br>[1,7 - 3,5]       | 2,2 *<br>[1,4 - 3,2]     | 9,3<br>[5,9 - 16,9]   | 4,1 *<br>[2,1 - 8,9]       | 4,5 *<br>[2,4 - 8,7]     |
| DN  | 3,4<br>[2,3 - 5,4]    | 4,6<br>[3,5 - 6,6]         | 4,8<br>[3,6 - 6,5]       | 5,3<br>[2,4 - 8,2]    | 7,2 *<br>[5,3 - 11,6]      | 7,5 *<br>[5,0 - 12,9]    |
| DP  | 0,6<br>[0,4 - 1,4]    | 0,6<br>[0,5 - 0,9]         | 0,6<br>[0,5 - 0,9]       | 4,0<br>[2,8 - 7,9]    | 1,2 *<br>[0,8 - 1,9]       | 2,2 *,**<br>[1,3 - 3,9]  |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>                      | 20,8<br>[19,1 - 22,6] | 21,4<br>[18,0 - 25,0]      | 22,5 **<br>[18,2 - 24,8] | 23,8<br>[16,0 - 33,6] | 13,3 *<br>[11,1 - 18,8]    | 20,5 **<br>[14,0 - 26,1] |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>                     | 3,1<br>[2,0 - 3,8]    | 3,8<br>[3,0 - 5,3]         | 3,9<br>[3,0 - 5,1]       | 7,3<br>[5,1 - 12,9]   | 4,1 *<br>[3,4 - 6,0]       | 5,8 **<br>[4,2 - 8,3]    |
| Th/CTL  | 2,1<br>[1,7 - 2,5]    | 1,5 *<br>[1,2 - 1,9]       | 1,6 *<br>[1,2 - 1,9]     | 2,0<br>[1,5 - 2,6]    | 4,1 *<br>[2,5 - 4,9]       | 2,0 **<br>[1,4 - 3,0]    |

Примечание: \* - отличие от группы сравнения, \*\* - отличие показателей от острого периода. О.П. – острый период, П.Р. – период реконвалесценции.

При сопоставлении ССЛ крови в остром периоде ВМ с показателями группы сравнения выявлено увеличение относительного содержания NKT и снижение Th. Коэффициент Th/CTL в крови детей в остром периоде ВМ был ниже относительно группы сравнения, вследствие значительного сокращения содержания Th и не меняющегося содержания CTL. В динамике заболевания содержание общих Т-клеток, Th, CTL и их субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup> в крови возрастало, тогда как содержание В-лимфоцитов снижалось. При этом

соотношение Th/CTL в периоде реконвалесценции ВМ оставалось сниженным относительно группы сравнения, вследствие пропорционального увеличения обеих субпопуляций. Среди всех субпопуляций крови только содержание НКТ в периоде реконвалесценции ВМ оставалось выше показателей группы сравнения.

Анализ полученных данных субпопуляционного состава лимфоцитов крови у детей разного возраста с ВМ не выявил существенных отличий от нормы ни в одной из возрастных подгрупп. Однако отмечено увеличение НКТ клеток с возрастом и тенденция к увеличению NK, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK и снижению DN вне зависимости от периода заболевания (ПРИЛОЖЕНИЕ А. табл. 1).

В ЦСЖ острого периода ВМ обнаружено увеличение содержания Th, NK и DN Т-клеток, снижение CTL и её фенотипов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup>), НКТ и DP Т-клеток. Коэффициент Th/CTL в острый период ВМ в ЦСЖ был почти в 2 раза выше аналогичного показателя у детей с ОРВИ за счёт активного накопления Th и сокращения CTL. В динамике заболевания наблюдалось достоверное снижение общих Т-клеток, Th и увеличение CTL, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup>, DP Т-клеток и В-лимфоцитов, нормализация соотношения Th/CTL. Однако содержание малых субпопуляций в ликворе (DP и DN Т-клеток, НКТ, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK) достоверно отличалось от группы сравнения и в период реконвалесценции. Также отмечено, что содержание В-лимфоцитов в динамике ВМ увеличивалось, и в период реконвалесценции было достоверно выше уровня в группе сравнения. Нормализация соотношения Th/CTL осуществлялась за счёт снижения Th и увеличения CTL.

В ликворе детей разного возраста при ВМ при сравнении с возрастной «нормой» выявлены те же закономерности, что и в целом по группе. При этом отмечено увеличение с возрастом Th и коэффициента Th/CTL и снижение содержания DN, аналогично группе сравнения. Уровень NK не отличался в разных возрастных группах, в отличие от снижения этих клеток с

возрастом в группе сравнения (Приложение А. табл. 2).

Проведён корреляционный анализ показателей системного воспаления с субпопуляционным составом лимфоцитов крови у детей при ВМ. Выявлена обратная корреляция общего количества лейкоцитов в крови с Т-клетками и их субпопуляцией Th ( $r = -0,32$ ,  $r = -0,37$ , соответственно,  $p < 0,05$ ) и прямая с В-лимфоцитами ( $r = 0,3$ ,  $p < 0,05$ ). В период реконвалесценции взаимосвязь общих лейкоцитов с Т-клетками сохраняет силу и направленность ( $r = -0,31$ ,  $p < 0,05$ ). Количество палочкоядерных нейтрофилов в крови прямо коррелирует с относительным содержанием DP ( $r = 0,52$ ,  $p < 0,05$ ).

Уровень цитоза в ликворе детей острого периода ВМ прямо коррелировал с относительным содержанием Th и коэффициентом Th/CTL ( $r = 0,23$ ,  $r = 0,36$ , соответственно,  $p < 0,05$ ) и обратно с CTL и DN ( $r = -0,25$ ,  $r = -0,35$ , соответственно,  $p < 0,05$ ). В период реконвалесценции положительная корреляционная связь цитоза наблюдается только с % содержанием  $CD3^+CD8^{br}$  ( $r = 0,31$ ,  $p < 0,05$ ).

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов в зависимости от этиологии показал, что в остром периоде и в период реконвалесценции ВМ в крови и ЦСЖ статистически значимых различий субпопуляционного состава лимфоцитов в группе энтеровирусного менингита и серозного менингита неустановленной этиологии не выявлено.

Таким образом, при ВМ выявлены различия субпопуляционного состава лимфоцитов в зависимости от стадии заболевания. При вирусной инфекции в системном кровотоке увеличивается роль НК и НКТ, в ликворе возрастает роль Th, НК,  $CD3^-CD8^+NK$  - субпопуляции отвечающие за регуляцию и связь врождённого и адаптивного иммунитета, а также за уничтожение заражённых вирусом клеток. Анализ полученных данных субпопуляционного состава лимфоцитов крови у детей разного возраста с ВМ не выявил существенных отличий от нормы ни в одной из возрастных подгрупп. Однако отмечено увеличение НКТ клеток с возрастом и тенденция к увеличению НК и снижению DN вне зависимости от периода заболевания.

### 3.3.2. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора при бактериальном гнойном менингите у детей

При БГМ в остром периоде заболевания в крови выявлено снижение содержания Т-лимфоцитов, Th, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup> Т-лимфоцитов относительно уровня показателей в группе сравнения. Напротив, доля В-клеток в крови более чем вдвое превышала аналогичный показатель при ОРВИ. Коэффициент Th/CTL в крови детей в остром периоде БГМ не отличался от группы сравнения вследствие пропорционального снижения содержания Th и CTL (табл. 12).

Таблица 12 - Относительное содержание основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ликвора у детей с вирусным серозным менингитом и группы сравнения.

| Содержание (%). Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] |                           |                                |                          |                            |                                |                             |
|---|---------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Популяции лимфоцитов                                    | КРОВЬ                     |                                |                          | ЛИКВОР                     |                                |                             |
|   | Группа сравнения<br>(n=8) | Бактериальный гнойный менингит |                          | Группа сравнения<br>(n=27) | Бактериальный гнойный менингит |                             |
|   |                           | О.П.<br>(n=24)                 | П.П.<br>(n=26)           |                            | О.П.<br>(n=32)                 | П.П.<br>(n=28)              |
| T-cells   | 72,4<br>[67,1 - 77,7]     | 50,7 *<br>[43,7 - 61,9]        | 70,9 **<br>[62,7 - 76,9] | 96,2<br>[94,3 - 97,6]      | 79,5 *<br>[72,2 - 86,5]        | 88,4 *, **<br>[83,7 - 93,8] |
| Th  | 45,6<br>[36,6 - 52,9]     | 30,9 *<br>[25,4 - 37,7]        | 41,4 **<br>[34,7 - 48,0] | 53,4<br>[47,0 - 61,6]      | 49,0 *<br>[31,3 - 54,7]        | 51,1<br>[39,5 - 57,7]       |
| CTL   | 22,7<br>[21,3 - 24,5]     | 16,0<br>[11,7 - 23,2]          | 23,1 **<br>[17,2 - 28,5] | 28,2<br>[20,1 - 34,8]      | 19,0 *<br>[13,7 - 23,2]        | 26,8 **<br>[20,7 - 31,7]    |
| NK  | 6,8<br>[2,4 - 10,5]       | 3,2<br>[1,8 - 5,4]             | 3,5<br>[1,4 - 5,7]       | 2,2<br>[1,0 - 3,1]         | 3,6 *<br>[2,1 - 7,4]           | 3,8 *<br>[1,9 - 7,4]        |
| B-cells   | 17,6<br>[13,8 - 20,3]     | 43,8 *<br>[29,1 - 52,4]        | 21,5 **<br>[15,2 - 33,0] | 0,7<br>[0,2 - 1,7]         | 12,8 *<br>[7,1 - 19,6]         | 4,2 *, **<br>[1,7 - 6,8]    |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> NK                    | 2,6<br>[1,2 - 3,6]        | 1,4<br>[0,8 - 1,9]             | 1,3<br>[0,9 - 2,7]       | 0,3<br>[0,0 - 1,2]         | 0,8 *<br>[0,6 - 1,4]           | 0,9 *<br>[0,6 - 1,9]        |
| NKT   | 0,9<br>[0,4 - 2,7]        | 0,4<br>[0,2 - 1,4]             | 0,8<br>[0,3 - 2,3]       | 9,3<br>[5,9 - 16,9]        | 3,7 *<br>[1,7 - 5,7]           | 3,5 *<br>[1,9 - 6,6]        |
| DN  | 3,4<br>[2,3 - 5,4]        | 2,1<br>[1,3 - 4,6]             | 3,0<br>[1,8 - 5,1]       | 5,3<br>[2,4 - 8,2]         | 7,4<br>[4,2 - 11,0]            | 8,0 *<br>[5,5 - 10,0]       |
| DP  | 0,6<br>[0,4 - 1,4]        | 0,5<br>[0,3 - 0,8]             | 0,8 **<br>[0,6 - 1,2]    | 4,0<br>[2,8 - 7,9]         | 1,6 *<br>[0,8 - 2,4]           | 1,8 *<br>[1,2 - 2,9]        |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>                      | 20,8<br>[19,1 - 22,6]     | 15,0<br>[10,5 - 22,0]          | 20,7 **<br>[16,2 - 27,0] | 23,8<br>[16,0 - 33,6]      | 14,7 *<br>[11,6 - 22,3]        | 24,4 **<br>[16,4 - 29,2]    |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>                     | 3,1<br>[2,0 - 3,8]        | 1,6 *<br>[1,1 - 2,3]           | 2,3 **<br>[1,9 - 3,5]    | 7,3<br>[5,1 - 12,9]        | 4,8 *<br>[3,0 - 6,4]           | 5,0 *<br>[3,9 - 6,0]        |
| Th/CTL  | 2,1<br>[1,7 - 2,5]        | 2,0<br>[1,3 - 2,7]             | 1,7<br>[1,4 - 2,5]       | 2,0<br>[1,5 - 2,6]         | 2,6<br>[1,5 - 3,4]             | 2,0 **<br>[1,2 - 2,4]       |

Примечание: \* - отличие от группы сравнения, \*\* - отличие показателей от острого периода. О.П. – острый период, П.П. – период реконвалесценции.

К стадии реконвалесценции содержание общих Т-лимфоцитов, Th, CTL и её фенопитов ( $CD3^+CD8^{br}$  и  $CD3^+CD8^{dim}$ ), DP Т-клеток достоверно увеличивалось, а доля В-лимфоцитов сокращалась. По причине относительно пропорционального увеличения содержания Th и CTL коэффициент Th/CTL в период реконвалесценции БГМ в крови детей достоверно не отличался от группы сравнения (табл. 12).

При БГМ, также, как и в целом по группе, у детей разного возраста в крови выявлено в остром периоде снижение Т-клеток, Th и увеличение содержания В-клеток по сравнению с возрастными литературными показателями, с практической нормализацией к периоду реконвалесценции, а в возрастных группах 3-12 месяца, 1-2 года, 2-6 лет отмечено незначительное снижение НК клеток по сравнению с литературной нормой как в остром периоде, так и в период реконвалесценции. При БГМ обнаружена тенденция к увеличению с возрастом относительного содержания Т-клеток, CTL, НК и большинства малых субпопуляций и снижению относительного содержания В-лимфоцитов (Приложение А, табл. 3).

В отличие от крови в ЦСЖ в остром периоде БГМ наблюдалось увеличение содержания НК и  $CD3^-CD8^+NK$  по сравнению с показателями при ОРВИ (табл. 12). Распределение других субпопуляций лимфоцитов относительно группы сравнения в ЦСЖ были аналогичны изменениям в крови. Так, в остром периоде заболевания обнаружено существенное снижение общих Т-клеток, Th, CTL и её субпопуляций  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$ , NKT и DP Т-лимфоцитов, при значительно большем количестве В-клеток, НК,  $CD3^-CD8^+$  НК и DN Т-лимфоцитов относительно группы сравнения (табл. 13). Коэффициент Th/CTL был сопоставим с показателем у детей с ОРВИ за счёт пропорционального сокращения обеих субпопуляций. В динамике заболевания обнаружено достоверное увеличение общих Т-клеток, CTL,  $CD3^+CD8^{br}$  и снижение В-лимфоцитов по сравнению с острым периодом, однако, содержание большинства субпопуляций отличалось от группы сравнения. Нормализация соотношения Th/CTL в динамике БГМ

происходила за счёт увеличения содержания CTL.

При БГМ в связи с отсутствием в группе сравнения детей раннего возраста (3-12 месяцев, 1-2 лет) показатели субпопуляционного состава лимфоцитов ЦСЖ сравнивались с «нормой» только у детей 2-6 и 6-12 лет. В возрастных подгруппах обнаружены те же закономерности в изменениях субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора, как и в целом по группе больных БГМ. Отмечено увеличение с возрастом в ликворе содержания T-клеток, Th и существенное снижение содержания В-лимфоцитов в старших возрастных подгруппах (особенно в возрасте 6-12 лет), характерное для всех периодов заболевания (Приложение А. табл. 4). В целом, возрастные изменения обусловлены физиологическими процессами созревания иммунной системы, но также отражают некоторые характеристики патогенеза БГМ.

При БГМ в остром периоде выявлена обратная взаимосвязь общих лейкоцитов с относительным содержанием DN T-лимфоцитов ( $r = -0,42$ ,  $p < 0,05$ ) и СРБ с относительным содержанием Th ( $r = -0,45$ ,  $p < 0,05$ ). В период реконвалесценции БГМ количество общих лейкоцитов взаимосвязано с относительным содержанием DN T-лимфоцитов и NK ( $r = -0,38$ ,  $r = -0,53$ , соответственно,  $p < 0,05$ ). СРБ в крови периода реконвалесценции коррелирует с относительным содержанием NK ( $r = -0,44$ ,  $p < 0,05$ ).

Уровень цитоза в ликворе в остром периоде БГМ прямо коррелирует с относительным содержанием Th и коэффициентом Th/CTL ( $r = 0,48$ ,  $r = 0,57$ , соответственно,  $p < 0,05$ ) и обратно с CTL и их субпопуляцией  $CD3^+CD8^{br}$  ( $r = -0,44$ ,  $r = -0,4$ , соответственно,  $p < 0,05$ ). В период реконвалесценции прослеживается обратная корреляция уровня цитоза и НКТ, DP и  $CD3^+CD8^{dim}$  ( $r = -0,39$ ,  $r = -0,51$ ,  $r = -0,38$ , соответственно,  $p < 0,05$ ).

Анализ изменений ССЛ крови и ЦСЖ в зависимости от этиологии БГМ позволил выявить определенные различия. Так, максимальные отклонения от группы сравнения в крови острого периода БГМ выявлены в ССЛ у детей, переносящих гемофильный менингитом (ГМ). При этом, сравнительный

анализ ССЛ различных этиологических форм БГМ показал в остром периоде и периоде реконвалесценции сниженное содержание CTL и их субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup> у детей с ГМ в сравнении с менингококковым менингитом ММ (табл. 13).

Таблица 13 - Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов крови детей при бактериальном гнойном менингите в зависимости от этиологии заболевания.

| Показатели                           | Период | Группа сравнения   | Бактериальный гнойный менингит. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ]. |                      |                         |
|--------------------------------------|--------|--------------------|--|----------------------|-------------------------|
|                                      |        |                    | Менингококковый менингит   | Гемофильный менингит | Пневмококковый менингит |
| T-cells                              | Остр.  | 72,4 [67,1 - 77,7] | 54,8 [44,6 - 61,9]   | 47,9 [37,4 - 50,5]   | 65,8 [37,7 - 77,3]      |
|                                      | Рек.   | -                  | 71,5 [64,4 - 78,0]   | 69,5 [59,6 - 75,8]   | 64,0 [56,6 - 78,6]      |
| Th                                   | Остр.  | 45,6 [36,6 - 52,9] | 30,8 [24,5 - 36,6]   | 30,9 [24,0 - 36,7]   | 51,8 [25,3 - 52,0]      |
|                                      | Рек.   | -                  | 37,8 [34,3 - 44,9]   | 47,9 [42,9 - 55,4]*  | 41,5 [32,6 - 47,3]      |
| CTL                                  | Остр.  | 22,7 [21,3 - 24,5] | 18,4 [13,5 - 24,8]   | 12,8 [8,3 - 14,3]*   | 11,1 [10,0 - 23,0]      |
|                                      | Рек.   | -                  | 24,5 [19,6 - 32,6]   | 12,0 [10,5 - 21,6]*  | 20,6 [17,3 - 27,9]**    |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>   | Остр.  | 20,8 [19,1 - 22,6] | 17,3 [12,8 - 23,8]   | 10,6 [7,8 - 13,6]*   | 10,4 [8,2 - 22,1]       |
|                                      | Рек.   | -                  | 23,3 [18,9 - 28,9]   | 14,6 [9,9 - 22,2]*   | 18,3 [16,4 - 26,9]      |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>  | Остр.  | 3,1 [2,0 - 3,8]    | 1,8 [1,1 - 2,7]  | 1,2 [0,8 - 1,8]      | 1,7 [1,2 - 2,2]         |
|                                      | Рек.   | -                  | 2,3 [1,9 - 3,6]  | 1,7 [1,4 - 3,2]      | 2,9 [2,4 - 3,0]         |
| DN                                   | Остр.  | 3,4 [2,3 - 5,4]    | 2,4 [1,3 - 5,9]  | 2,1 [1,2 - 3,6]      | 1,7 [1,4 - 2,0]         |
|                                      | Рек.   | -                  | 3,1 [1,7 - 5,9]  | 3,4 [2,2 - 5,7]      | 2,9 [1,7 - 4,4]         |
| DP                                   | Остр.  | 0,6 [0,4 - 1,4]    | 0,6 [0,3 - 0,8]  | 0,3 [0,2 - 0,4]      | 1,0 [0,4 - 1,1]         |
|                                      | Рек.   | -                  | 0,9 [0,6 - 1,2]  | 0,86 [0,57 - 1,15]   | 0,89 [0,66 - 1,80]      |
| NKT                                  | Остр.  | 0,9 [0,4 - 2,7]    | 0,5 [0,2 - 2,2]  | 0,5 [0,2 - 0,6]      | 0,30 [0,02 - 0,31]      |
|                                      | Рек.   | -                  | 1,1 [0,3 - 2,7]  | 0,6 [0,2 - 1,9]      | 0,8 [0,2 - 2,6]         |
| NK                                   | Остр.  | 6,8 [2,4 - 10,5]   | 3,1 [1,2 - 5,4]  | 3,1 [1,8 - 5,2]      | 3,5 [0,8 - 6,9]         |
|                                      | Рек.   | -                  | 3,2 [1,4 - 6,4]  | 2,4 [0,7 - 4,9]      | 5,1 [3,7 - 27,1]        |
| B-cells                              | Остр.  | 17,6 [13,8 - 20,3] | 37,0 [28,1 - 51,4]   | 47,7 [46,5 - 56,1]   | 30,1 [17,7 - 52,4]      |
|                                      | Рек.   | -                  | 20,4 [15,0 - 30,5]   | 25,9 [17,8 - 37,7]   | 16,9 [12,7 - 30,4]      |
| CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> NK | Остр.  | 2,6 [1,2 - 3,6]    | 1,6 [0,7 - 2,6]  | 1,0 [0,8 - 1,6]      | 1,6 [0,7 - 1,9]         |
|                                      | Рек.   | -                  | 1,4 [0,9 - 3,2]  | 0,7 [0,5 - 1,4]*     | 2,2 [1,5 - 9,8]         |
| Th/CTL                               | Остр.  | 2,1 [1,7 - 2,5]    | 1,7 [1,3 - 2,3]  | 2,9 [1,9 - 3,7]*     | 2,5 [2,3 - 4,7]*        |
|                                      | Рек.   | -                  | 1,5 [1,1 - 2,3]  | 4,1 [2,3 - 4,8]*     | 1,7 [1,6 - 2,4]         |

Примечание: \* - отличие от ММ \*\* - отличие ГМ от ПМ

У детей с пневмококковым менингитом (ПМ) в сравнении с ММ в остром периоде также снижено относительное содержание CTL и их субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup> (p=0,16; p=0,19, соответственно), тогда как в период реконвалесценции содержание обеих субпопуляций возрастает, при этом CTL достоверно в сравнении с ГМ. Коэффициент Th/CTL в крови острого периода и фазы реконвалесценции ГМ выше, в сравнении с ММ, тогда как при ПМ он выше только в остром периоде. Также в период реконвалесценции в крови детей с ГМ выше в сравнении с ММ и ПМ (тенденция) содержание Th и ниже в сравнении с ММ и ПМ (тенденция) содержание CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK.



В отличие от крови максимальное отклонение от группы сравнения в ЦСЖ острого периода БГМ выявлены для ССЛ детей, переносящих ММ. При этом в сравнении с ММ у детей с ГМ и ПМ (тенденция) в ЦСЖ острого периода заболевания выявлено повышенное содержание CTL (табл. 14).

Таблица 14 - Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов цереброспинальной жидкости детей при бактериальном гнойном менингите в зависимости от этиологии заболевания.

| Показатели                              | Период | Группа сравнения   | БГМ. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ]. |                         |                         |
|---|--------|--------------------|---|-------------------------|-------------------------|
|   |        |                    | Менингококковый менингит                      | Гемофильный менингит    | Пневмококковый менингит |
| T-cells                                 | Остр.  | 96,2 [94,3 - 97,6] | 78,7 [65,9 - 82,7]                            | 81,6 [75,1 - 90,0]      | 80,6 [77,1 - 93,1]      |
|   | Рек.   | -                  | 89,6 [83,3 - 95,1]                            | 87,0 [82,8 - 89,6]      | 85,5 [84,1 - 94,3]      |
| Th                                      | Остр.  | 53,4 [47,0 - 61,6] | 48,9 [41,5 - 53,3]                            | 43,6 [28,1 - 55,6]      | 51,3 [28,1 - 65,2]      |
|   | Рек.   | -                  | 50,9 [40,6 - 57,7]                            | 51,3 [32,5 - 57,9]      | 38,8 [21,1 - 54,67]     |
| CTL                                     | Остр.  | 28,2 [20,1 - 34,8] | 16,4 [13,1 - 19,3]                            | 22,5 [19,0 - 34,7]<br>* | 31 [12,6 - 42,3]        |
|   | Рек.   | -                  | 25,3 [19,3 - 29,5]                            | 21,0 [19,0 - 34,7]      | 32,5 [28,6 - 51,1]      |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>      | Остр.  | 23,8 [16,0 - 33,6] | 14,0 [10,7 - 18,3]                            | 16,3 [13,8 - 30,0]      | 25,6 [11,7 - 39,5]      |
|   | Рек.   | -                  | 22,4 [16,2 - 29,2]                            | 17,9 [15,0 - 32,8]      | 27,5 [25,9 - 38,9]      |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>     | Остр.  | 7,3 [5,1 - 12,9]   | 4,3 [3,2 - 5,9]                               | 6,1 [2,6 - 7,5]         | 4,7 [2,7 - 7,6]         |
|   | Рек.   | -                  | 4,7 [3,9 - 5,7]                               | 5,5 [4,5 - 5,9]         | 7,3 [3,8 - 14,8]        |
| DN                                      | Остр.  | 5,3 [2,4 - 8,2]    | 7,6 [4,6 - 11,3]                              | 7,7 [3,5 - 17,8]        | 6,4 [2,7 - 8,2]         |
|   | Рек.   | -                  | 6,7 [4,8 - 8,9]                               | 6,6 [4,4 - 22,5]        | 10,1 [9,8 - 12,6]       |
| DP                                      | Остр.  | 4,0 [2,8 - 7,9]    | 1,5 [1,1 - 2,5]                               | 1,2 [0,4 - 2,5]         | 1,9 [0,5 - 2,4]         |
|   | Рек.   | -                  | 1,8 [1,3 - 2,9]                               | 2,8 [0,9 - 3,2]         | 1,6 [1,0 - 2,2]         |
| NKT                                     | Остр.  | 9,3 [5,9 - 16,9]   | 3,0 [1,6 - 5,6]                               | 4,6 [1,4 - 10,4]        | 4,5 [3,7 - 6,3]         |
|   | Рек.   | -                  | 3,1 [1,9 - 6,6]                               | 4,2 [1,3 - 7,4]         | 4,5 [3,5 - 8,1]         |
| NK                                      | Остр.  | 2,2 [1,0 - 3,1]    | 3,7 [2,2 - 7,4]                               | 3,3 [1,6 - 7,3]         | 4,0 [1,8 - 9,4]         |
|   | Рек.   | -                  | 3,1 [1,8 - 7,0]                               | 6,2 [2,4 - 8,3]         | 7,4 [1,9 - 12,9]        |
| B-cells                                 | Остр.  | 0,7 [0,2 - 1,7]    | 14,2 [10,1 - 20,0]                            | 10,1 [6,1 - 20,0]       | 8,8 [3,5 - 16,0]        |
|   | Рек.   | -                  | 3,9 [1,6 - 5,7]                               | 6,3 [5,1 - 8,1]         | 3,3 [0,9 - 8,5]         |
| CD3 <sup>-</sup><br>CD8 <sup>+</sup> NK | Остр.  | 0,3 [0,0 - 1,2]    | 1,0 [0,6 - 1,7]                               | 0,8 [0,6 - 1,1]         | 0,6 [0,3 - 0,7]         |
|   | Рек.   | -                  | 0,85 [0,62 - 1,97]                            | 0,92 [0,76 - 1,7]       | 1,6 [0,6 - 2,8]         |
| Th/CTL                                  | Остр.  | 2,0 [1,5 - 2,6]    | 2,8 [2,0 - 4,2]                               | 1,9 [0,9 - 2,9]         | 1,8 [0,7 - 5,2]         |
|   | Рек.   | -                  | 2,1 [1,5 - 2,4]                               | 2,0 [1,0 - 3,1]         | 1,2 [0,4 - 1,9]<br>*    |

Примечание: \* - отличие от ММ, \*\* - отличие ГМ от ПМ

Также в ЦСЖ периода реконвалесценции детей с ПМ ниже коэффициент Th/CTL в сравнении с ММ и ГМ (без достоверности) и показателем группы сравнения.

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов крови у детей с БГМ не выявил значимых различий в относительном содержании лимфоцитов в зависимости от степени тяжести. При этом в ЦСЖ на момент диагностической ЛП у детей с крайне тяжелой формой БГМ выявлено более высокое содержание CTL, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, DN и NKT и сниженное Th (без

достоверности), относительное содержание В-лимфоцитов. Коэффициент Th/CTL у группы крайне тяжелых детей также достоверно ниже (табл. 15).

Таблица 15 - Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов ликвора в остром периоде бактериального гнойного менингита у детей в зависимости от тяжести.

| Группы (n)                           | Me [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ]. |                                   | Уровень значимости p |
|--------------------------------------|--|-----------------------------------|----------------------|
|                                      | Относительное содержание (%)             |                                   |                      |
|                                      | Тяжёлая степень БГМ (n=14)               | Крайне тяжёлая степень БГМ (n=13) |                      |
| T-cells                              | 77,4 [71,9 – 80,9]                       | 83,9 [77,3 – 89,9]                | 0,17                 |
| Th                                   | 51,4 [43,5 – 61,3]                       | 44,3 [27,2 – 52,7]                | 0,1                  |
| CTL                                  | 16,4 [12,7 – 19,6]                       | 20,1 [17,5 – 25,6] *              | <0,05                |
| DN                                   | 5,1 [3,8 – 9,2]                          | 8,3 [6,3 – 15,9] *                | <0,05                |
| DP                                   | 1,3 [0,7 – 1,8]                          | 2,2 [1,1 – 3,0]                   | 0,11                 |
| NK                                   | 2,8 [1,5 – 7,2]                          | 7,0 [3,6 – 8,1]                   | 0,09                 |
| B-cells                              | 16,4 [11,4 – 19,8]                       | 10,0 [4,0 – 14,5] *               | <0,05                |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>   | 13,1 [11,3 – 15,7]                       | 17,3 [14,4 – 22,8]                | 0,06                 |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>  | 3,9 [2,8 – 5,0]                          | 5,9 [4,9 – 7,8] *                 | <0,05                |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> NK | 0,8 [0,5 – 1,7]                          | 1,0 [0,7 – 1,6]                   | 0,57                 |
| NKT                                  | 1,6 [0,9 – 3,5]                          | 5,3 [3,2 – 6,1] *                 | <0,005               |
| Th/CTL                               | 3,0 [2,4 – 4,4]                          | 2,3 [1,2 – 2,8] *                 | <0,05                |

Примечание: \* - отличия от группы с тяжёлой формой БГМ.

Для характеристики диагностической значимости ССЛ в оценке тяжести состояния детей при БГМ проведён ROC-анализ наиболее значимых показателей субпопуляций лимфоцитов крови и ЦСЖ. Высокую чувствительность и специфичность для оценки тяжести БГМ показали: относительное содержание NKT, DN, CTL, коэффициента Th/CTL, а также относительное содержание В-лимфоцитов в ЦСЖ (табл. 16).

Таблица 16 – Показатели чувствительности и специфичности относительного содержания диагностически значимых субпопуляций лимфоцитов ликвора у пациентов в тяжёлом и крайне тяжёлом состоянии бактериального гнойного менингита в остром периоде заболевания.

| Субпопуляции                        | Me [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] |                                   | AUC  | Cutoff % | Specificity % | Sensitivity % |
|-------------------------------------|---|-----------------------------------|------|----------|---------------|---------------|
|                                     | Тяжёлая степень БГМ (n=14)              | Крайне тяжёлая степень БГМ (n=13) |      |          |               |               |
| NKT                                 | 1,6 [0,9 – 3,5]                         | 5,3 [3,3 – 6,1]                   | 0,84 | >3,0     | 84,6          | 78,6          |
| DN                                  | 5,1 [3,8 – 9,2]                         | 8,3 [6,3 – 15,9]                  | 0,74 | >7,7     | 69,2          | 71,4          |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup> | 3,9 [2,8 – 5,0]                         | 5,9 [4,9 – 7,8]                   | 0,77 | >5,3     | 75,0          | 84,6          |
| CTL                                 | 16,4 [12,7 – 19,6]                      | 20,1 [17,7 – 25,5]                | 0,74 | >17,9    | 77,0          | 71,4          |
| B-cells                             | 16,4 [11,4 – 19,8]                      | 10,0 [3,9 – 14,4]                 | 0,72 | <13,8    | 76,9          | 71,4          |
| Th/CTL                              | 3,0 [2,4 – 4,4]                         | 2,3 [1,2 – 2,8]                   | 0,75 | <2,78    | 76,9          | 64,3          |

Примечание: все представленные показатели в сравниваемых группах достоверно различаются. AUC – площадь под кривой, Cutoff – отсечка, Specificity – специфичность, Sensitivity – чувствительность.

Максимальной чувствительностью (84,6%) и специфичностью (78,6%) обладало определение относительного содержания NKT. Предположительно,

НКТ в ЦНС реализуют иммуносупрессорные функции за счёт экспрессии цитокинов, тем самым подавляя воспалительные реакции и снижая интенсивность иммунного ответа на инфекционный агент.

Таким образом, при БГМ выявлены различия субпопуляционного состава лимфоцитов в зависимости от стадии заболевания, этиологии и степени тяжести. Увеличение количества В-лимфоцитов в крови и особенно ЦСЖ острого периода и периода реконвалесценции БГМ свидетельствует о стимуляции гуморального звена иммунитета. В возрастных подгруппах обнаружены те же закономерности в изменениях субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора, как и в целом по группе больных БГМ.

### 3.4. Соотношение субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора и крови при менингитах

Для выявления особенностей интратекального и системного клеточного иммунного ответа проведены расчёты коэффициентов ЦСЖ/кровь для исследованных субпопуляций лимфоцитов у детей с менингитами и ОРВИ (табл. 17).

Таблица 17 - Соотношение содержания субпопуляций лимфоцитов цереброспинальной жидкости и крови при менингитах и острой респираторной вирусной инфекции у детей.

| Субпопуляции Лимфоцитов              | Коэффициент ЦСЖ/кровь. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ]. |                            |                             |                                |                               |
|--------------------------------------|---|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                                      | Группа сравнения (n=9)  | Вирусный серозный менингит |                             | Бактериальный гнойный менингит |                               |
|                                      |   | О.П. (n=59)                | П.Р. (n=35)                 | О.П. (n=20)                    | П.Р. (n=26)                   |
| T-cells                              | 1,29<br>[1,18 - 1,41]   | 1,39<br>[1,28 - 1,55]      | 1,30 **<br>[1,23 - 1,41]    | 1,55<br>[1,26 - 1,73]          | 1,23 **<br>[1,17 - 1,39]      |
| Th                                   | 1,38<br>[1,00 - 1,60]   | 1,75 *<br>[1,49 - 2,13]    | 1,36 **<br>[1,05 - 1,66]    | 1,50 ***<br>[1,14 - 1,95]      | 1,17 **<br>[0,90 - 1,43]      |
| CTL                                  | 1,20<br>[0,76 - 1,49]   | 0,73 *<br>[0,55 - 0,87]    | 1,03 **<br>[0,73 - 1,16]    | 1,26 ***<br>[0,84 - 1,77]      | 1,18 ***<br>[0,86 - 1,60]     |
| NK                                   | 0,21<br>[0,15 - 0,92]   | 0,35<br>[0,18 - 0,69]      | 0,34<br>[0,17 - 0,56]       | 2,04 *, ***<br>[0,79 - 3,57]   | 0,83 *, ***<br>[0,39 - 4,02]  |
| B-cells                              | 0,07<br>[0,02 - 0,23]   | 0,02<br>[0,01 - 0,06]      | 0,07 **<br>[0,04 - 0,21]    | 0,34 *, ***<br>[0,13 - 0,48]   | 0,19 ***<br>[0,07 - 0,34]     |
| CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> NK | 0,31<br>[0,10 - 2,29]   | 0,19<br>[0,10 - 0,40]      | 0,17<br>[0,10 - 0,43]       | 0,85 ***<br>[0,34 - 1,35]      | 0,81 ***<br>[0,25 - 1,57]     |
| NKT                                  | 16,36<br>[3,55 - 39,72]   | 2,13 *<br>[0,72 - 4,19]    | 1,91 *<br>[0,84 - 6,42]     | 7,44 ***<br>[2,07 - 32,69]     | 5,08 ***<br>[1,80 - 9,88]     |
| DN                                   | 1,17<br>[0,73 - 1,62]   | 1,73 *<br>[1,13 - 2,60]    | 1,44<br>[1,05 - 2,60]       | 3,64 *, ***<br>[2,37 - 7,17]   | 2,94 *, ***<br>[1,42 - 5,05]  |
| DP                                   | 7,19<br>[5,71 - 18,40]  | 1,94 *<br>[1,18 - 2,89]    | 3,98 *, **<br>[2,15 - 6,26] | 3,19 *, ***<br>[2,22 - 4,09]   | 1,91 *, ***<br>[1,33 - 3,60]  |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>   | 1,16<br>[0,80 - 1,50]   | 0,65 *<br>[0,51 - 0,86]    | 1,00 **<br>[0,70 - 1,25]    | 1,20 ***<br>[0,75 - 1,72]      | 1,07<br>[0,85 - 1,52]         |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>  | 2,72<br>[1,87 - 4,00]   | 1,12 *<br>[0,73 - 1,77]    | 1,43 *, **<br>[1,12 - 1,74] | 3,24 ***<br>[2,50 - 5,58]      | 2,02 **, ***<br>[1,47 - 3,79] |

Примечание: \* - отличие от группы сравнения, \*\* - отличие показателей периода реконвалесценции от острого периода, \*\*\* - отличия показателей при бактериальном гнойном менингите от показателей при вирусном серозном менингите. О.П. – острый период, П.Р. – период реконвалесценции.

В группе сравнения установлено превалирование в ЦСЖ большинства субпопуляций (коэффициенты варьировали от 1,2 до 16,4), за исключением В-клеток, NK и CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK, количество которых в ЦСЖ было снижено по сравнению с кровью (коэффициенты варьировали от 0,07 до 0,31). При анализе системного и интратекального иммунного ответа при ОРВИ

обнаружено значительно более высокое относительное содержание в ликворе (по сравнению с кровью) лимфоцитов основных субпопуляций - общих Т-клеток и Th, а среди малых субпопуляций - НКТ (более чем в 16 раз) и DP Т-клеток (более чем в 7 раз), а также  $CD3^+CD8^{dim}$  CTL (более чем 2,7 раза), что можно объяснить экстренной миграцией этих клеток из кровотока в рамках механизма защиты ЦНС от вирусной экспансии. Так, у пациентов с невоспалительными неврологическими заболеваниями, такими как головная боль, соматоформное расстройство и другие, обнаружено накопление в ЦСЖ DP Т-лимфоцитов [159]. Схожие полученные в настоящем исследовании пропорции выявлены у пациентов без воспалительных заболеваний ЦНС в отношении основных субпопуляций, DN Т-лимфоцитов, а также НКТ клеток [72]. По-видимому, значительный прирост клеток этих субпопуляций в ЦСЖ характеризует эффективный иммунный ответ при вирусной инфекции, предотвращающий вовлечение в процесс ЦНС. Большинство перечисленных клеточных популяций обладают цитотоксической активностью, что в совокупности с более чем 10 кратным превосходством содержания НКТ в ЦСЖ может свидетельствовать о высоком потенциале противоинфекционной защиты ЦНС.

При ВМ, в отличие от группы сравнения, в остром периоде коэффициент ЦСЖ/кровь был выше для Th и DN Т-лимфоцитов, ниже для CTL, НКТ,  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$  (табл. 18). При этом CTL и  $CD3^+CD8^{dim}$  клеток в ЦСЖ становится меньше, чем в кровотоке. В период реконвалесценции ВМ в сравнении с острым периодом происходят значительные изменения в распределении субпопуляций в биологических жидкостях: коэффициент ЦСЖ/кровь снижается для Т-клеток, Th и увеличивается для CTL, В-клеток, DP Т-клеток,  $CD3^+CD8^{br}$  и  $CD3^+CD8^{dim}$ . Однако, несмотря на явную тенденцию к «нормализации», коэффициент ЦСЖ/кровь для НКТ, DP и  $CD3^+CD8^{dim}$  Т-клеток остаётся сниженным в сравнении с показателями при ОРВИ.

При БГМ соотношение основных и малых субпопуляций лимфоцитов в ЦСЖ и крови было заметно иным, чем при ВМ и ОРВИ (табл. 18). Так, в ЦСЖ детей в остром периоде БГМ значительно увеличивался коэффициент для НК (в 9,7 раз по сравнению с ОРВИ, в 5,8 раз по сравнению с ВМ) и В-клеток (в 4,9 раз по сравнению с ОРВИ, в 17 раз по сравнению с ВМ). Соотношение ЦСЖ/кровь для CTL было сопоставимо с показателем при ОРВИ и значительно выше, чем в острый период ВМ (коэффициент 1,26 при БГМ против 0,73 при ВМ). К периоду ранней реконвалесценции коэффициенты ЦСЖ/кровь приближались к показателям группы сравнения только для Т-клеточного звена, в то время как для НК, В-клеток коэффициент оставался выше, а для большинства малых субпопуляций ниже.

Расчёт коэффициента ЦСЖ/кровь позволил выявить некоторые особенности патогенеза ВМ и БГМ. В остром периоде ВМ и БГМ относительное содержание общих Т-лимфоцитов, Th, а также клеток малых субпопуляций - NKT, DP и DN Т-клеток, а при БГМ и  $CD3^+CD8^{dim}$  Т-клеток значительно выше в ЦСЖ в сравнении с кровью, что может свидетельствовать об участии этих субпопуляций в механизмах локальной иммунной защиты при менингитах у детей. В остром периоде ВМ и БГМ коэффициент ЦСЖ/кровь для Th возрастает, при этом в случае ВМ значительно. По-видимому, Th обладают повышенной способностью преодолевать ГЭБ/ГЛБ, что важно для поддержания гомеостаза иммунной системы мозга в физиологических условиях и при патологии ЦНС [69,92].

Иная ситуация выявлена в отношении CTL и НК. В остром периоде ВМ наблюдается снижение коэффициента для CTL (и субпопуляции истинных цитотоксических лимфоцитов -  $CD3^+CD8^{br}$ , но не  $CD3^+CD8^{dim}$ ), тогда как при БГМ этот коэффициент не отличался от группы сравнения. Коэффициент ЦСЖ/кровь для НК в остром периоде БГМ доходит до 2,04, что значительно выше показателя при ВМ (0,35) и ОРВИ (0,21). Выявленные отличия в соотношении субпопуляций лимфоцитов в ликворе и крови при ОРВИ, ВМ и БГМ обусловлены различными механизмами иммунного ответа при вирусной

и бактериальной инфекции. Функциональное значение лимфоцитов и свойство ГЭБ/ГЛБ избирательно регулировать проницаемость для клеток различных популяций определяет состав иммунокомпетентных клеток в ЦСЖ для обеспечения наиболее эффективного иммунного ответа при нейроинфекциях различной этиологии.

Таким образом, выявлены существенные различия в соотношении субпопуляций в ЦСЖ и крови при ВМ и БГМ в разные периоды заболевания, отражающие различную проницаемость ГЭБ/ГЛБ для патогенетически значимых субпопуляций лимфоцитов. Можно предположить, что мозговые барьеры являются активными участниками контроля иммунного гомеостаза нервной системы в норме и патологии.

### 3.5. Дифференциально-диагностическая значимость показателей субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора

Сопоставление субпопуляционного состава лимфоцитов в целом по группам ВМ и БГМ выявило значимые различия между их относительным содержанием в крови и в ликворе (рис. 9).

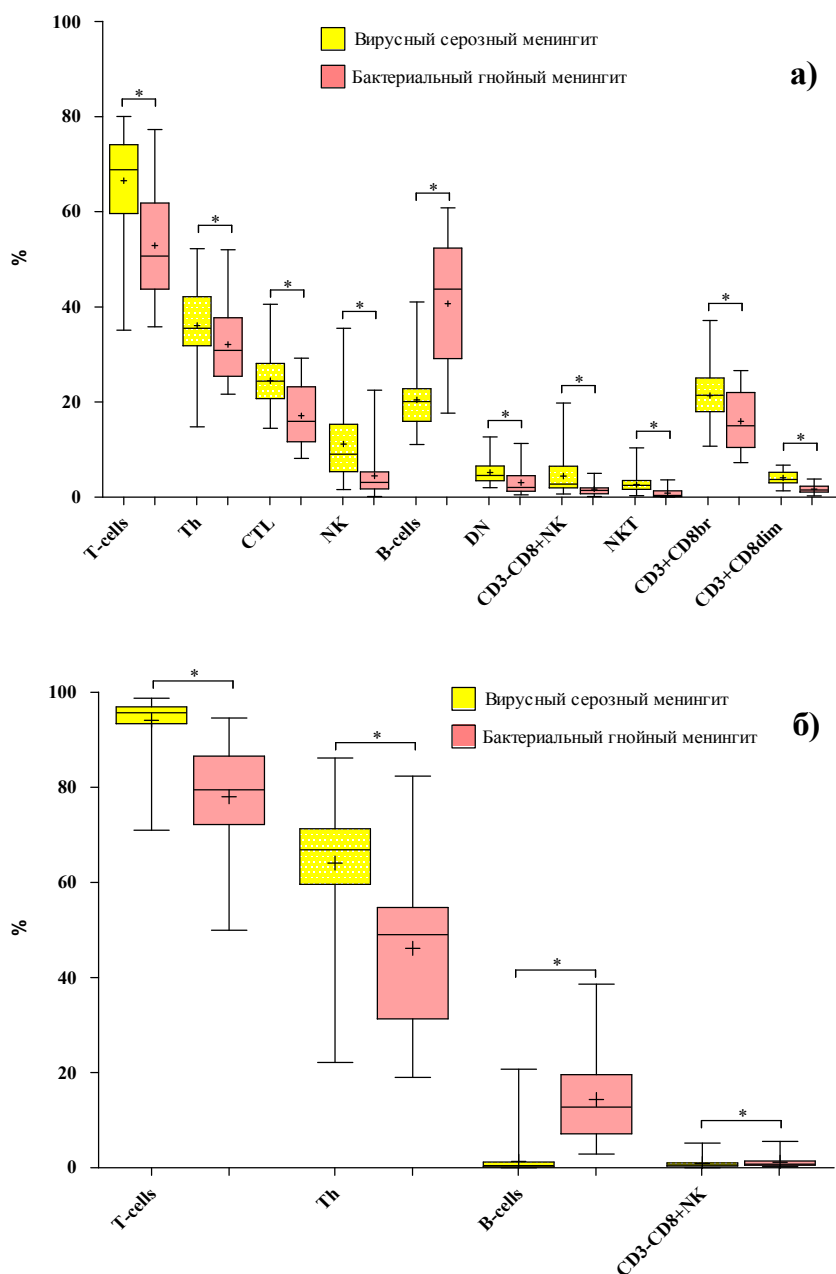


Рисунок 9. Сопоставление относительного содержания субпопуляций лимфоцитов крови (а) и цереброспинальной жидкости (б) детей с вирусным серозным и бактериальным гнойным менингитом в остром периоде заболевания (\* -  $p < 0,05$ ).



Так, в крови острого периода ВМ в сравнении с БГМ выявлено более высокое относительное содержание общих Т-лимфоцитов, Th, CTL, NK, DN, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK, NKT, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup> и значительно более низкое содержание В-лимфоцитов (рис. 9а). Для ЦСЖ характерно более низкое содержание общих Т-лимфоцитов, Th и более высокое содержание CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK и В-лимфоцитов при БГМ в сравнении с показателями при ВМ (рис. 9б).

Коэффициент Th/CTL в целом по группе детей с ВМ в остром периоде заболевания в крови ниже, чем у детей с БГМ (1,5 [1,2 – 1,9] vs. 2,0 [1,3 – 2,7], p=0,0069). Напротив, в ликворе острого периода у детей с ВМ в сравнении с БГМ соотношение Th/CTL было значительно выше (4,1 [2,5 – 4,9] vs. 2,6 [1,5 – 3,4], p=0,0006).

К периоду реконвалесценции содержание общих Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови сопоставимо при обеих нозологических формах, тогда как содержание NK, DN, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK, NKT и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup> в крови при БГМ остаётся ниже, а В-лимфоцитов выше, чем при ВМ (рис. 10а). В ЦСЖ стадии реконвалесценции относительное содержание Т- и В-лимфоцитов при ВМ достоверно отличалось от значений при БГМ (рис. 10б).

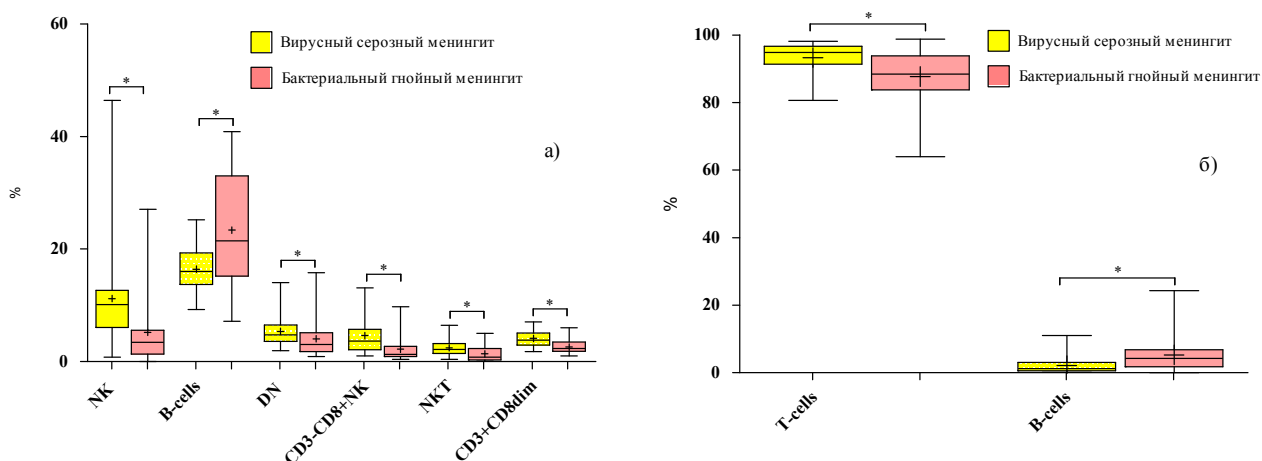


Рисунок 10. Сопоставление относительного содержания субпопуляций лимфоцитов крови (а) и цереброспинальной жидкости (б) пациентов с вирусным серозным и бактериальным гнойным менингитом в период реконвалесценции заболевания (\* - p<0,05).

Коэффициент Th/CTL в целом по группам детей с ВМ и БГМ достоверно не отличался ни в крови, ни в ликворе.

Проведена оценка параметров ССЛ в качестве дифференциально-диагностических критериев менингита вирусной и бактериальной природы у детей с верифицированным возбудителем заболевания. В крови максимальная чувствительность и специфичность ( $AUC > 0,9$ ) выявлена для относительного содержания  $CD3^+CD8^{dim}$ , В-клеток (табл. 18). Так, содержание  $CD3^+CD8^{dim}$  менее 2,5% и В-клеток более 24,9% с высокой вероятностью указывает на инфекцию бактериальной природы, тогда как содержание  $CD3^+CD8^{dim}$  более 2,5% и В-клеток менее 24,9% - на инфекцию вирусной природы.

Таблица 18 – Показатели чувствительности и специфичности относительного содержания диагностически значимых субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с вирусным и бактериальным менингитом в остром периоде заболевания.

| Субпопуляции                         | Me [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] |                               | AUC  | Cutoff % | Specificity % | Sensitivity % |
|--------------------------------------|---|-------------------------------|------|----------|---------------|---------------|
|                                      | Вирусный менингит (n=36)                | Бактериальный менингит (n=24) |      |          |               |               |
| T-cells                              | 70,0 [63,3 – 74,8]                      | 50,7[43,7 – 61,8]             | 0,85 | <58,0    | 70,83         | 91,67         |
| Th                                   | 38,0 [33,2 – 42,4]                      | 30,9 [25,4 - 37,7]            | 0,73 | <32,2    | 62,5          | 83,33         |
| CTL                                  | 24,4 [21,2 – 27,8]                      | 16,0 [11,7 – 23,2]            | 0,80 | <19,0    | 66,67         | 88,89         |
| NK                                   | 8,3 [5,6 – 15,1]                        | 3,1 [1,8 – 5,4]               | 0,83 | <5,9     | 83,33         | 75,00         |
| B-cells                              | 19,0 [15,8 – 21,6]                      | 43,8 [29,1 – 52,4]            | 0,92 | >24,9    | 87,5          | 86,11         |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> NK | 2,4 [1,9 – 6,2]                         | 1,4 [0,8 – 1,9]               | 0,80 | <2,0     | 79,17         | 75,00         |
| NKT                                  | 2,7 [1,8 – 3,6]                         | 0,4 [0,2 – 1,3]               | 0,87 | <0,9     | 70,83         | 97,22         |
| DN                                   | 4,7 [3,7 – 6,6]                         | 2,1 [1,3 – 4,6]               | 0,79 | <2,8     | 66,67         | 91,67         |
| DP                                   | 0,6 [0,5 – 1,0]                         | 0,5 [0,3 – 0,8]               | 0,65 | <0,6     | 58,33         | 63,89         |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>   | 21,3 [18,8 – 23,1]                      | 15,0 [10,5 – 22,0]            | 0,73 | <16,9    | 62,5          | 86,11         |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>  | 4,1 [3,2 – 5,6]                         | 1,6 [1,1 – 2,3]               | 0,95 | <2,5     | 83,33         | 97,22         |
| Th/CTL                               | 1,5 [1,2 – 1,9]                         | 2,0 [1,3 – 2,7]               | 0,67 | >1,6     | 70,83         | 58,33         |

Примечание: все представленные показатели в сравниваемых группах достоверно различаются. AUC – площадь под кривой, Cutoff – отсечка, Specificity – специфичность, Sensitivity – чувствительность.

В ЦСЖ высокими показателями чувствительности и специфичности для дифференциальной диагностики менингита вирусной и бактериальной природы обладало относительное содержание общих Т-лимфоцитов, Th и коэффициент отношения Th/CTL, а наиболее значимым показателем относительное содержание В-лимфоцитов (табл. 19).

Таблица 19 - Показатели чувствительности и специфичности относительного содержания диагностически значимых субпопуляций лимфоцитов ликвора пациентов с вирусным и бактериальным менингитом в остром периоде заболевания.

| Субпопуляции | Me [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] |                               | AUC  | Cutoff % | Specificity % | Sensitivity % |
|--------------|---|-------------------------------|------|----------|---------------|---------------|
|              | Вирусный менингит (n=44)                | Бактериальный менингит (n=32) |      |          |               |               |
| T-cells      | 95,9 [93,6 – 96,9]                      | 79,5 [72,2 – 86,5]            | 0,96 | <91,9    | 90,6          | 88,6          |
| Th           | 65,9 [61,2 – 72,3]                      | 49,0 [31,3 – 54,7]            | 0,87 | <57,9    | 84,4          | 84,1          |
| B-cells      | 0,4 [0,1 – 0,9]                         | 12,8 [7,1 – 19,6]             | 1,00 | >2,7     | 100           | 97,7          |
| Th/CTL       | 4,2 [2,6 – 5,0]                         | 3,4 [2,7 – 4,7]               | 0,73 | <2,8     | 62,5          | 70,5          |

Примечание: все представленные показатели в сравниваемых группах достоверно различаются. AUC – площадь под кривой, Cutoff – отсечка, Specificity – специфичность, Sensitivity – чувствительность.

Установлено, что относительное содержание В-лимфоцитов в ЦСЖ в остром периоде заболевания выше 2,72% было характерно для бактериального менингита, равное, или менее 2,72% - для вирусного. Чувствительность – 100% и специфичность данного критерия составляют 97,73% (Рис. 11. Патент).

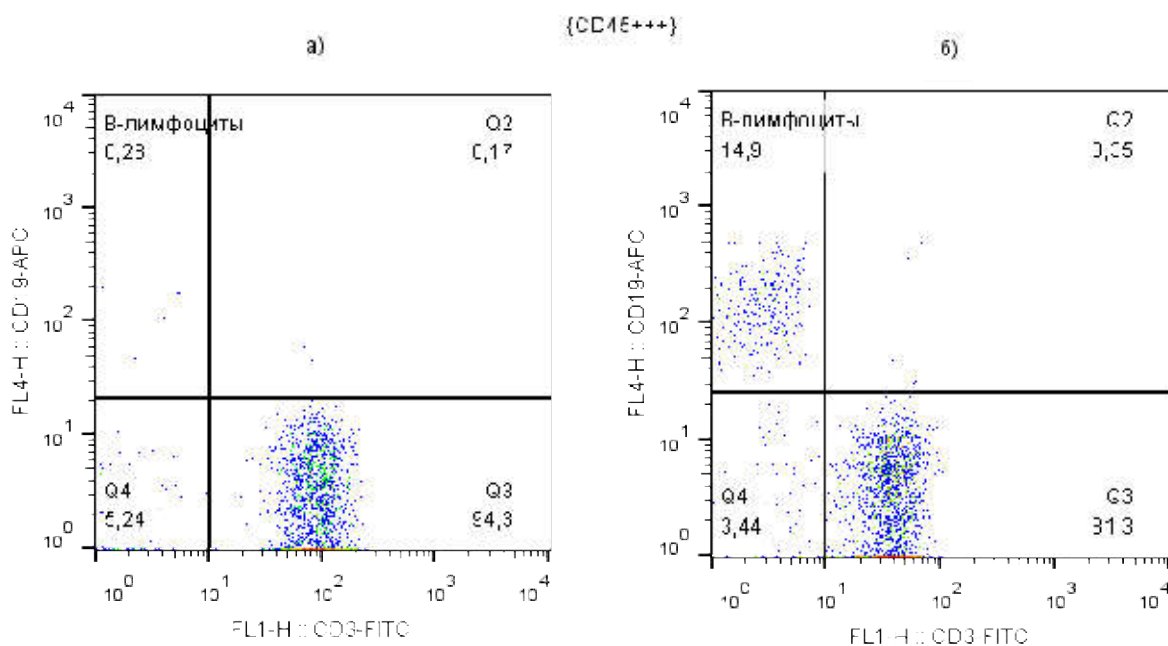


Рисунок 11. Относительное содержание В-лимфоцитов в цереброспинальной жидкости при вирусном серозном (а) и бактериальном гнойном менингите (б).

69% детей при ВМ и 67% при БГМ относились к группе 2-6 лет и 6-12 лет (см. Глава 3, рис. 2). ROC-анализ, проведенный отдельно по возрастным группам, подтвердил высокую эффективность использования определения относительного содержания В-лимфоцитов для дифференциальной

диагностики менингитов, но в разных возрастных диапазонах cut-off различался (рис. 12).

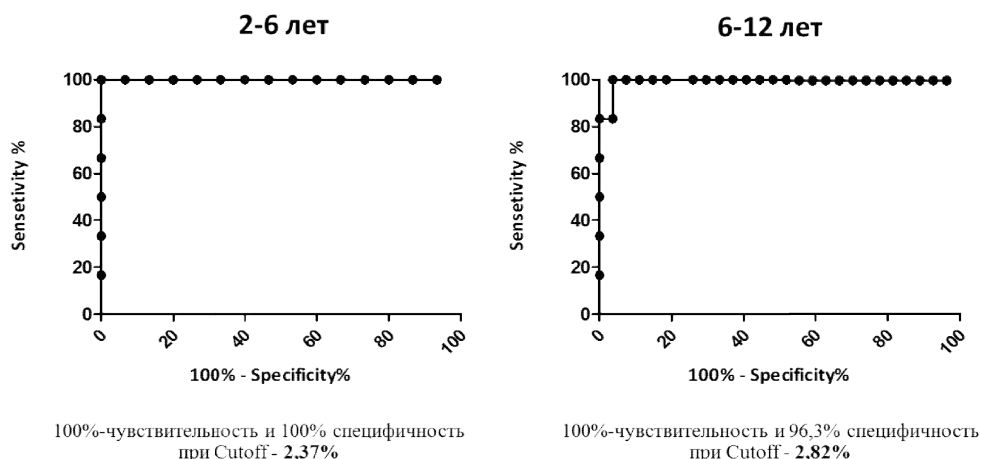


Рисунок 12. ROC-анализ эффективности использования относительного содержания В-лимфоцитов в ликворе для дифференциальной диагностики менингита у детей 2-6 лет (а) и 6-12 лет (б).

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ЦСЖ позволяет в кратчайшие сроки (в течение часа) провести дифференциальную диагностику менингита вирусной и бактериальной природы, основываясь на результатах субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора (рис. 13).

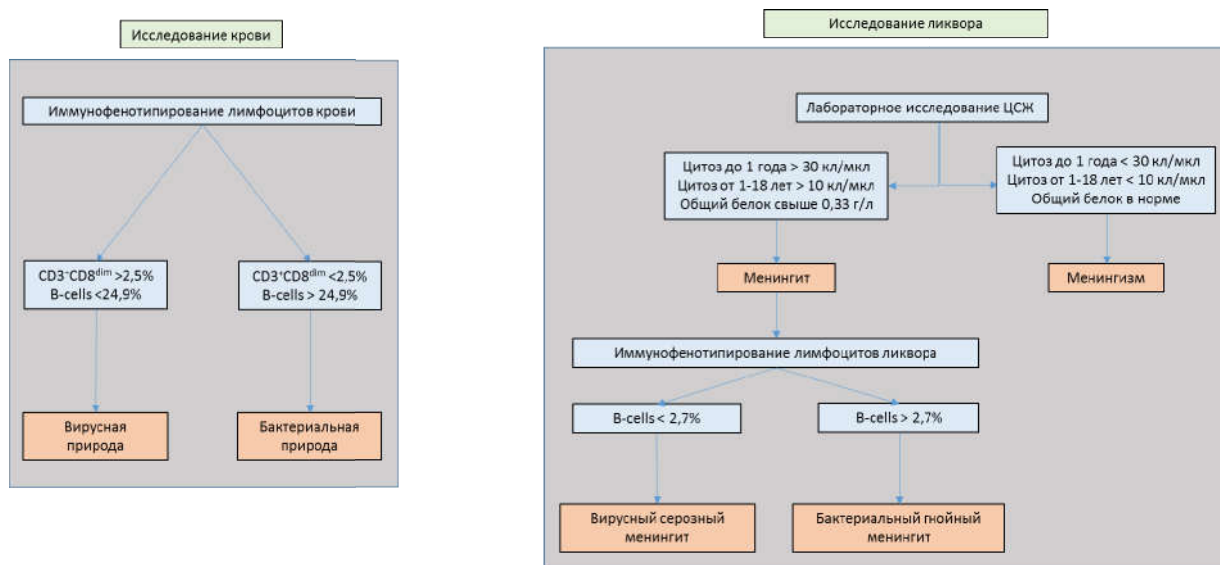


Рисунок 13. Схема диагностики менингита с применением стандартных методов ликворологической лабораторной диагностики и иммунофенотипирования лимфоцитов крови и ликвора.

Проведение люмбальной пункции, обязательное во всех случаях подозрения на менингит, обуславливает включение в схему лабораторного обследования дополнительного проведения иммунофенотипирования лимфоцитов, существенно повышающего эффективность дифференциальной диагностики. Определение относительного содержания В-лимфоцитов (пороговое значение 2,7%) позволяет с максимальной чувствительностью и специфичностью провести дифференциальную диагностику вне зависимости от характера цитоза ликвора и возраста ребёнка.

Фенотипирование лимфоцитов крови также может быть использовано для предварительного дифференциального диагноза в случае невозможности проведения люмбальной пункции по медицинским показаниям, например, при подозрении на дислокацию мозга. У детей, поступающих с подозрением на менингит увеличение содержания  $CD3^+CD8^{dim}$  выше 2,5% и снижение В-лимфоцитов ниже 24,9% с высокой достоверностью указывает на вирусную, а не на бактериальную природу инфекционного процесса. Более значительное увеличение  $CD3^+CD8^{dim}$  при вирусной природе процесса по сравнению с бактериальной может быть обусловлена функциональными свойствами этой минорной субпопуляции. Показано, что  $CD3^+CD8^{dim}$  проявляют слабую цитотоксическую активность, имеют замедленную пролиферацию, нарушенную передачу сигналов Т-клеточного рецептора и экспрессируют отличный от  $CD45^+CD3^+CD8^{br}$  профиль цитокинов. Повышенное содержание  $CD3^+CD8^{dim}$  лимфоцитов в оба периода ВМ может быть связано с воздействием вируса на дифференциацию CTL, что отмечалось и при других вирусных инфекциях [55]. Увеличение содержания В-лимфоцитов в крови и ликворе при БГМ, свидетельствует о преимущественно гуморальном типе иммунного ответа при бактериальной инфекции.

Эффективность предлагаемого способа дифференциальной диагностики менингита может быть подтверждена на конкретных клинических примерах.

**Клинический пример № 1.** Больная В. 7 лет. Поступила в ФГБУ ДНКЦИБ на 6-е сутки заболевания с жалобами на усиление головной боли в лобно-теменной области. Состояние средней тяжести, лихорадит до 38 С° в течение 6-8 часов. Менингеальные симптомы сомнительные. Диагноз приёмного отделения: ОРИ, ринофарингит, подозрение на острый синусит и нейроинфекции. Назначена противовирусная терапия. При лабораторном обследовании: гемограмма без воспалительных изменений: лейкоциты крови -  $8,8 \cdot 10^9$  кл/л, нейтрофилы – 68%, лимфоциты - 26%, СОЭ – 14 мм/час. Биохимический анализ крови: СРБ - 15,9 мг/л. ССЛ крови свидетельствовал о признаках вирусной природы заболевания, а именно содержание  $CD3^+CD8^{dim}$  – 3,5%, В-клеток – 22,6%.

В день поступления проведена диагностическая ЛП. Полученный ликвор мутноватый. Общий белок - 0,5 г/л. Цитоз - 816 кл/мкл: нейтрофилы – 784 кл/мкл, мононуклеары - 32 кл/мкл. Данные стандартного исследования ликвора указывали на бактериальную природу (нейтрофильный плеоцитоз). С учётом полученных данных назначена терапия антибиотиками (цефтриаксон) в дополнение к противовирусной и противовоспалительной терапии. В ССЛ ликвора выявлено низкое содержание В-лимфоцитов (0,06%) и высокое Т-лимфоцитов (96,2%), что в совокупности соответствовало признакам вирусного процесса. На 2-й день после диагностической ЛП микробиологическое исследование не выявило ДНК менингококка, гемофильной палочки и пневмококка в крови и ликворе, вследствие чего 2-х дневная терапия антибиотиками была отменена. При проведении вирусологической диагностики методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) РНК энтеровируса в крови – отрицательно, в ликворе - положительно. Диагноз клинический основной при выписке - энтеровирусный серозный менингит, среднетяжёлое течение.

Таким образом, исследование ССЛ крови и ликвора уже в первый день поступления в стационар позволило уточнить природу заболевания и явилось поводом для коррекции терапии. Полученные результаты в дальнейшем

нашли подтверждение при верификации возбудителя вирусологическими и микробиологическими методами.

**Клинический пример № 2.** Больной М. 5 лет. Доставлен переводом из ЦРБ другого города с осложнениями ветряной оспы на 10-е сутки после начала заболевания. Менингеальные симптомы положительные. Общее состояние тяжёлое, сознание ясное. По данным лабораторных исследований в клиническом анализе крови: лейкоциты  $13,1 \cdot 10^9$  кл/л, нейтрофилы – 77%, лимфоциты – 21,1%, СОЭ – 40 мм/ч. Биохимический анализ: СРБ – 1,8 мг/л (за 2 дня до диагностической ЛП 116 мг/л). В крови обнаружена ДНК вируса ветряной оспы и вируса Эпштейна-Барр. Проводилась антибактериальная (лендацин) и противовирусная (ацикловир) терапия. На основании клинико-лабораторных данных предполагали наличие БГМ, не исключая ветряночный менингоэнцефалит. На 2-е сутки после поступления проведена диагностическая ЛП. Стандартные показатели: ликвор бесцветный, прозрачный, белок – 0,233 г/л, цитоз – 679 кл/мкл, нейтрофилы 437 кл/мкл, мононуклеары – 237 кл/мкл. Сниженный белок ликвора и смешанный цитоз не позволяли дифференцировать природу возбудителя. При этом иммунофенотипировании лимфоцитов ликвора выявило крайне высокое содержание В-лимфоцитов - 30,9%, и низкое Т-лимфоцитов - 65,9%, что однозначно указывало на бактериальный характер инфекции. В дальнейшем методом ПЦР в режиме «реального времени» и в реакции латекс-агглютинации удалось верифицировать *Neisseria meningitidis* серотипа В. На основании клинико-лабораторных данных был поставлен диагноз основной: менингококковый менингит серогруппы В. Сопутствующий: ветряная оспа без осложнений.

Таким образом, исследование субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора на поздних сроках заболевания, несмотря на неоднозначные стандартные показатели ликвора, позволило уточнить природу менингита, что в дальнейшем нашло подтверждение при верификации возбудителя

микробиологическими методами. Результаты лабораторных исследований явились поводом для коррекции терапии.

**Клинический пример № 3.** Больной Ж. 9 лет 8 месяцев. В стационар ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России поступил на 2-е сутки заболевания с жалобами на повышение температуры тела до фебрильных цифр, головную боль, многократную рвоту, светобоязнь. Общее состояние тяжёлое за счёт общемозгового синдрома. Менингеальные симптомы положительные. Гемограмма: лейкоциты  $13,7 \cdot 10^9$  кл/л, нейтрофилёз 85%, повышенное СОЭ – 23 мм/ч. Биохимический анализ: СРБ – 3,9 мг/л.

Диагностическая пункция произведена в день поступления. Ликвор бесцветный, прозрачный. Общий белок - 0,48 г/л, цитоз – 301 кл/мкл, нейтрофилы 157 кл/мкл, мононуклеары – 144 кл/мкл. Смешанный характер плеоцитоза в совокупности с тяжёлым состоянием пациента не позволяли предположить природу возбудителя. Промежуточный диагноз: серозный менингит неустановленной этиологии. Проводилась противовирусная терапия (виферон). В качестве дополнительного лабораторного дифференциально-диагностического критерия проведено иммунофенотипирование лимфоцитов ликвора методом ПЦ. Относительное содержание основных субпопуляций лимфоцитов составило: В-лимфоцитов – 0,4%, Т-лимфоцитов - 95,8%, что соответствовало вирусной природе менингита. В дальнейшем методом ПЦР в режиме «реального времени» обнаружена РНК энтеровируса. Диагноз клинический при выписке: энтеровирусный менингит.

Таким образом, несмотря на тяжесть состояния и противоречивые данные показателей ликвора, фенотипирование лимфоцитов ликвора позволило установить вирусную природу возбудителя, что в дальнейшем было подтверждено вирусологическими методами этиологической диагностики.

**Клинический пример № 4.** Больной Л. 10 месяцев 10 дней. Поступил в стационар ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России на 4-е сутки от начала



заболевания с жалобами на подъем температуры и насморк. В семье контакт по ОРВИ. Общее состояние средней тяжести за счёт общеинфекционного синдрома. Менингеальные симптомы сомнительные. Гемограмма: лейкоциты –  $20,1 \cdot 10^9$  кл/л, нейтрофилы – 46,5%, лимфоциты – 47,1%, палочкоядерный сдвиг до 11%, СОЭ – 45 мм/ч. Биохимический анализ: СРБ - 17,7 мг/л. По результатам вирусологического и бактериологического обследования патогенных микроорганизмов не обнаружено. Промежуточный диагноз: вирусная инфекция неустановленной природы. Проводилась противовирусная (виферон) и антибактериальная (сультасин) терапия. Фенотипирование лимфоцитов крови не позволило однозначно определить признаки природы возбудителя  $CD3^+CD8^{dim}$  составили 2,2%, что соответствовало бактериальной природе, тогда как содержание В-клеток указывало на вирусную природу – 17,7%.

На 3-и сутки после поступления проведена диагностическая люмбальная пункция. Ликвор бесцветный, мутноватый. Общий белок - 1,14 г/л. Цитоз - 1005 кл/мкл, нейтрофилы 467 кл/мкл, мононуклеары – 520 кл/мкл. Смешанный характер плеоцитоза не позволял с уверенностью судить о природе заболевания. Иммунофенотипирование лимфоцитов ликвора показало содержание В-лимфоцитов – 8,8%, Т-лимфоцитов – 81,0%, что однозначно указывало на бактериальную природу менингита. Состояние средней тяжести с отрицательной динамикой (в течение дня до тяжёлого). В связи с тяжестью состояния ребёнок переведён в отделение интенсивной терапии. Клинический диагноз: бактериальный гнойный менингит неустановленной этиологии, неуточнённая острая инфекция верхних дыхательных путей. На 2-е сутки после диагностической ЛП по результатам ПЦР ликвора выявлена ДНК *Streptococcus pneumoniae*. Основной клинический диагноз при выписке: Пневмококковый менингит. Таким образом, исследование ССЛ ликвора на 3-й день после поступления в стационар позволило уточнить природу заболевания, что в затем нашло

подтверждение при верификации возбудителя микробиологическими методами.

Таким образом, приведённые клинические примеры показывают эффективность иммунофенотипирования лимфоцитов ликвора для дифференциальной диагностики менингита вирусной и бактериальной природы в случае сомнительных стандартных клинико-лабораторных показателей.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ограниченное число сведений о составе лимфоцитов ликвора в норме и при патологии и их диагностическом значении определило цель и задачи настоящего исследования. Из-за невозможности исследования ликвора у здоровых детей нами с помощью оптимизированного метода проточной цитометрии проведено исследование ССЛ у детей группы сравнения разного возраста, которую составили пациенты, поступившие в клинику ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России с подозрением на менингит, но окончательный диагноз которых – ОРВИ с менингизмом. С учётом сведений о функциональной роли не только основных, но и малых субпопуляций использованный метод позволил охарактеризовать состав лимфоцитов крови и ликвора у детей группы сравнения и детей, переносящих менингиты вирусной и бактериальной природы.

Полученные в настоящем исследовании результаты частично согласуются с данными литературы о субпопуляционном составе лимфоцитов ЦСЖ практически здоровых взрослых, либо пациентов без заболеваний ЦНС [69,142]. В частности, соотношение Th/CTL у здоровых доноров в работе [142] было несколько выше в сравнении с полученными в настоящем исследовании (табл. 9). По-видимому, превалирование Th над CTL в ЦСЖ усиливается с возрастом, что выявлено нами при сопоставлении ССЛ у детей разных возрастных групп в интервале от 2 до 18 лет (табл. 10). Содержание в ЦСЖ у детей основных и малых (общих Т-лимфоцитов, NK, Th, CTL,  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$ , DNT-лимфоциты) субпопуляций лимфоцитов, вероятно, отражает этапы созревания иммунной системы мозга. Для детей младшего возраста, переносящих ОРВИ, характерно присутствие в ЦСЖ большего числа клеток врождённого иммунитета (NK,  $CD3^-CD8^+NK$ ), а также клеток переходного фенотипа (DP, DN и  $CD3^+CD8^{dim}$ ). С возрастом содержание этих клеток в ЦСЖ уменьшается, и у детей подросткового возраста показатели становятся сопоставимыми с таковыми у практически здоровых взрослых. Полученные при анализе лимфоцитов ЦСЖ детей при

ОРВИ с менингизмом данные могут быть использованы в качестве контроля (отсутствие признаков воспаления в ЦСЖ) при изучении иммунопатогенеза воспалительных заболеваний ЦНС у детей разных возрастных групп.

При изучении ССЛ крови и ликвора у детей, переносящих вирусные и бактериальные менингиты, установлены достоверные отличия от показателей группы сравнения. При этом отмечены как общие закономерности, так и выраженные отличия, позволившие разработать способ дифференциальной диагностики ВМ и БГМ на ранней стадии заболевания.

Основные изменения ССЛ крови при ВМ касались Th, NK, NKT и  $CD3^+CD8^{dim}$ . Так, снижение в крови острого периода ВМ содержания Th, вероятно, связано с миграцией данной субпопуляции в место локального воспаления (менингеальные оболочки). Увеличение количества NK клеток в крови детей при ВМ, также отмечено при исследовании динамики ССЛ больных ЕСНО-вирусным менингитом [105]. В настоящей работе у детей с ВМ выявлено более чем 2,5 - кратное превышение содержания NKT относительно значения группы сравнения. Известно, что NK и  $CD3^+CD16^+CD56^+NKT$  активно продуцируют неспецифический  $IFN-\gamma$ , который стимулирует клеточный иммунный ответ первого типа (Th1,  $IFN-\gamma$ ) эффективный против вирусных инфекций [39]. Увеличенное содержание NK и NKT при ВМ сохраняется и в периоде реконвалесценции, что может свидетельствовать о незавершенности инфекционного процесса. Повышенное содержание  $CD3^+CD8^{dim}$  лимфоцитов в оба периода ВМ может быть связано с воздействием вируса на дифференциацию CTL, что отмечалось также при других вирусных инфекциях [55].

Главной особенностью интратекального пула лимфоцитов при ВМ у детей в остром периоде было увеличение относительного содержания Th, NK и DN, при снижении CTL. В отличие от крови в ликворе наблюдалось резкое увеличение содержания Th и сокращение CTL, что согласуется с результатами, полученными при изучении мононуклеарных клеток у пациентов с вирусным менингитом (Echovirus 30) [109]. При этом количество

Th в остром периоде ВМ в ликворе почти 4 раза превосходило количество CTL. Подобное превалирование Th над CTL в ЦСЖ наблюдали при многих инфекционных заболеваниях нервной системы, включая вирусные и бактериальные менингиты [36,70,92]. Также, как и в крови, содержание NK клеток в ликворе детей при ВМ было выше группы сравнения. Обнаруженный в настоящей работе рост содержания DN T-клеток в ЦСЖ больных ВМ и БГМ (острый период), возможно, отражает механизм регуляции рекрутированных в ЦНС клеток адаптивного иммунного ответа. Так, ряд данных показывает гомеостатическую роль DN T-клеток в супрессии избыточного адаптивного T-клеточного ответа с ослаблением его повреждающего действия [47]. Выявленное у больных ВМ в период реконвалесценции увеличение В-клеток в ликворе можно объяснить необходимостью формирования иммунологической памяти [11].

В крови детей с БГМ наблюдаются значительные изменения ССЛ, связанные, в основном, со снижением содержания T-клеточного звена (Th, CTL, NKT), а также NK клеток и увеличением содержания В-лимфоцитов, что частично согласуется с данными Ichiyama T. и соавторов [81]. Снижение относительного содержания NKT и NK в крови больных БГМ наблюдали также Балмасова И.П. и соавторы, изучившие фенотипический состав лимфоцитов у взрослых пациентов с БГМ [6].

При БГМ, в отличие от ВМ, содержание Th в ЦСЖ сокращалось относительно группы сравнения. Количество CTL в ликворе также снижалось, оставаясь более чем в 2 раза ниже количества Th. Это согласуется с данными, полученными при исследовании пневмококкового и гемофильного БГМ [81]. В настоящем исследовании у детей с БГМ в остром периоде наблюдалось увеличение в ликворе содержания NK клеток и их субпопуляции CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK. Данные современной литературы показывают, что NK участвуют в борьбе с бактериальной инфекцией, в частности благодаря их способности распознавать бактериальные PAMPs с помощью системы PRR, продуцируя в ответ IFN- $\gamma$ , а также усиливать собственную

активность посредством выделяемых иммунными клетками (нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки) цитокинов [137]. Таким, образом, повышение уровня НК в ликворе при БГМ может свидетельствовать о необходимости данной субпопуляции для обеспечения противобактериальной защиты на протяжении всего периода заболевания, как одного из регуляторов иммунного ответа. Количество В-клеток в ликворе острого периода БГМ, также, как и в крови, резко возрастает. Проведённый в настоящем исследовании корреляционный анализ показывает, что увеличение содержания В-лимфоцитов при БГМ может быть индуцировано прямыми эффектами высокой концентрации СРБ. Так, в литературных источниках сообщается об ингибировании СРБ дифференцировки Th1 и стимуляции дифференцировки Th2 из наивных Т-хелперов. При этом Th2 характеризуется экспрессией IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и стимулирует пролиферацию В-лимфоцитов и продукцию ими иммуноглобулинов [167,171].

Обобщая полученные данные, можно констатировать, что в остром периоде ВМ и БГМ относительное содержание общих Т-лимфоцитов, Th, а также клеток малых субпопуляций — NKT, DP и DN Т-клеток, а при БГМ и  $CD3^+CD8^{dim}$  Т-клеток значительно выше в ЦСЖ в сравнении с кровью, что может свидетельствовать об участии этих субпопуляций в механизмах локальной иммунной защиты при менингитах у детей. Изменения ССЛ могут свидетельствовать о различных механизмах иммунопатогенеза, обусловленных вирусных или бактериальным микроорганизмом. Анализ соотношений субпопуляций ликвора и крови позволил оценить особенности интратекального и системного иммунного ответа при БГМ и ВМ, в частности его лимфоцитарного состава. Известно, что он определяется несколькими процессами: накоплением (пролиферация) и сокращением (клеточная гибель) численности, а также активностью миграции клеток в тканях и органах. Коэффициент ликвор/кровь для всех субпопуляций лимфоцитов при ВМ в сравнении с БГМ достоверно отличается, что свидетельствует о значимых

патогенетических отличиях менингитов вирусной и бактериальной природы. Максимальное значение при ВМ имеет динамика Th и CTL, в то время как у больных БГМ - В-лимфоцитов, NK клеток и DNT-лимфоцитов. При этом значение большинства малых субпопуляций (NKT, DP,  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$ ,  $CD3^-CD8^+NK$ ) при БГМ выше в сравнении с ВМ, что может говорить о вовлечении большего количества компонентов иммунной системы в противобактериальный иммунный ответ.

Обнаруженная корреляционная взаимосвязь в ликворе цитоза и относительного содержания Th, CTL и их субпопуляций  $CD3^+CD8^{br}$ , DN и NKT клеток, по всей видимости, отражает способность клеток этих типов преодолевать ГЭБ/ГЛБ. Прямая направленность корреляции цитоза с относительным (%) содержанием Th и, напротив, обратный характер корреляции в отношении CTL и их субпопуляцией  $CD3^+CD8^{br}$  (при БГМ), и DN и NKT клеток при ВМ, возможно свидетельствует о фундаментальных особенностях раннего фазы интратекального иммунного ответа при данных нозологических формах. Особенно отчётливо это видно на фоне отсутствия взаимосвязи цитоза и относительного (%) содержания лимфоцитов в группе сравнения. Предположение о селективной проницаемости ГЭБ/ГЛБ для разных субпопуляций Т-лимфоцитов подтверждается данными о смещении баланса в ликворе острого периода БГМ, и в особенности ВМ, в сторону Th, что приводит к увеличению соотношения Th/CTL в сравнении с условной нормой.

На основании результатов проведённого исследования можно утверждать, что имеются характерные для ВМ и БГМ особенности системного и интратекального лимфоцитарного пула. На ранних этапах заболевания в системном кровотоке вследствие непосредственного воздействия антигенов возбудителя на иммунокомпетентные клетки происходит формирование уникального профиля лимфоцитов, необходимого для борьбы с разными типами патогенов. При вирусной инфекции в системном кровотоке увеличивается роль NK и NKT, субпопуляций

отвечающих за регуляцию и связь врождённого и адаптивного иммунитета, а также за уничтожение заражённых вирусом клеток. При БГМ значительно возрастает роль гуморального звена иммунитета, происходит стимуляция пролиферации В-лимфоцитов, синтезирующих нейтрализующие антитела, что является адекватным ответом на бактериальную инфекцию с преимущественно экстраклеточным типом паразитирования (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*) [133]. Активация и пролиферация В-лимфоцитов при бактериальных инфекциях, может осуществляться уже на уровне слизистых оболочек под действием бактериальных антигенов (пневмококковый полисахарид, липополисахарид, флагеллин), что в дальнейшем при миграции клеток в системный кровоток смещает баланс субпопуляций в сторону В-клеточного звена [155]. Насыщенность менингеальных оболочек В-клетками, также способствует активному участию этой субпопуляции в антибактериальном иммунном ответе у пациентов с БГМ.

При инфицировании ЦНС запускается локальный иммунный ответ в менингеальных оболочках мозга, который контролируется резидентными иммунными клетками мозга и мигрирующими иммунокомпетентными клетками крови. Ранняя стадия интратекального клеточного иммунного ответа характеризуется повышенной проницаемостью ГЭБ/ГЛБ для клеток с регуляторной активностью (Th) и снижением проницаемости для лимфоцитов с цитотоксической активностью (CTL). Возможно, что на начальных этапах воспаления в ЦНС важнее адаптировать («настроить») иммунный ответ под конкретного возбудителя, что осуществляется (Th) и снизить риск неспецифической цитотоксической активности (CTL) в отношении клеток и тканей ЦНС, которая могла бы привести к неврологическому дефициту или развитию аутоиммунных процессов. В целом при ВМ в ликворе возрастает роль Th, DN Т-клеток, NK, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK, тогда как при БГМ происходит значительная стимуляция В-клеточного звена. При менингитах вирусной и бактериальной природы на



системном и интратекальном уровне реализуется характерный для данного типа патогена клеточный иммунный ответ.

Важным аспектом патогенеза БГМ является взаимосвязь тяжести течения с ССЛ. Степень тяжести может быть обусловлена как факторами патогенности возбудителя, так и недостаточностью (дизрегуляцией или дисфункцией) иммунного ответа в целом, включая количественные изменения ССЛ. Можно предположить, что степень тяжести БГМ зависит от нарушения (разбалансировки) ключевых иммунологических процессов, являющихся критичными для успешного иммунного ответа при инфекционных заболеваниях. В отношении клеточного иммунного ответа к таковым можно отнести: баланс Th и В-лимфоцитов, а также уровень клеток с цитотоксической и иммуносупрессивной активностью. Th в целом определяют активность и направленность иммунного ответа. Их дисбаланс может приводить к развитию не оптимального в отношении конкретного типа патогена, или недостаточного иммунного ответа. В-лимфоциты, как ключевое звено гуморального иммунитета, важны для продукции антител, нейтрализующих возбудителя и продукты его жизнедеятельности. Нарушение процессов их активации и пролиферации может приводить к распространению возбудителя в макроорганизме. Цитотоксическая клеточная активность необходима для уничтожения заражённых клеток. При этом дисбаланс клеток с цитотоксической активностью может приводить либо к чрезмерному повреждению клеток и тканей, либо к недостаточно активному уничтожению инфицированных клеток. Процессы иммуносупрессии реализуются посредством экспрессии лимфоцитами (Т- и В-лимфоциты, DN, NKT) цитокинов IL-10, TGF- $\beta$  и др. При адекватном иммунном ответе с помощью этого механизма происходит контроль гипервоспалительной реакции. Однако, дисбаланс клеток с иммуносупрессивной активностью может приводить либо к снижению оптимального уровня воспаления и в целом к недостаточности иммунного ответа, либо к гипервоспалению.

Полученные в настоящей работе данные показывают взаимосвязь тяжести течения БГМ с клеточным иммунным ответом, характеризующуюся дисбалансом субпопуляций лимфоцитов. Так, при крайне тяжёлом течении БГМ в сравнении с тяжёлым наблюдался дефицит Th и В-клеток, при избытке CTL, DN, NKT. Тяжесть БГМ, по всей видимости, обусловлена недостаточно выраженным гуморальным иммунным ответом при усилении клеточного, который менее эффективен при бактериальной инфекции. Также можно предположить, что при крайне тяжёлом течении снижена интенсивность иммунных реакций на инфекционный агент за счёт иммуносупрессорной активности DN и NKT, а также наблюдается избыточное содержание клеток с цитотоксическим эффектом CTL ( $CD3^+CD8^{dim}$ ,  $CD3^+CD8^{br}$ ) NK, NKT и DP T-лимфоцитов.

По данным Балмасовой и соавторов [6] повышенное содержание абсолютного количества NKT в ликворе ассоциировалось с тяжёлым течением пневмококкового менингита, что авторы связали с иммуносупрессивной функцией этих клеток, направленной на подавление воспалительной реакции. Согласно другим литературным источникам показано, что  $CD8^+$ -лимфоциты (CTL) способны разрушать нервную ткань, в особенности нейроны, двумя способами: антигенспецифическая и контакт-опосредованная цитотоксичность [111]. В ряде исследований выявлена патогенная роль интратекальных  $CD8^+$ -лимфоцитов (CTL) в поражении ЦНС при вирусном энцефалите [70,128]. NK клетки в процессе воспалительных реакций также способны к повреждению нейронов, олигодендроцитов и глиальных клеток вследствие непосредственного цитолитического эффекта, или во взаимодействии с другими клетками врождённого и адаптивного иммунитета [132]. В иммунопатогенезе нейроинфекций отмечают важность интратекального баланса субпопуляций лимфоцитов для эффективной борьбы с возбудителями, поражающими ЦНС [70].

Поиск новых диагностических маркеров является актуальной задачей клинической лабораторной диагностики инфекционных заболеваний нервной

системы [119]. Клинический анализ крови и определение СРБ в крови в настоящем исследовании не показали высокой диагностической значимости в дифференциальной диагностике менингита, что также подтверждается исследованием Kim H. [86]. При этом ценность показателей ликвора в диагностике менингита значительно выше, чем показателей крови [96]. Эффективность использования стандартных показателей ликвора для дифференциальной диагностики менингита в ряде исследований подвергается сомнению [30], а необходимость дополнительных лабораторных критериев для дифференциальной диагностики отчётливо проявляется в случаях менингита с умеренным плеоцитозом ликвора [30,150]. В нашей работе мы обнаруживаем широкую область совпадения стандартных лабораторных показателей ликвора (белок, цитоз, моно- и полинуклеарные клетки), что подтверждается в большинстве исследований, оценивающих данные показатели в качестве диагностических маркеров бактериального или вирусного менингита [29,114]. Анализ диагностической значимости стандартных показателей ликвора выявляет недостаточно высокую эффективность использования цитоза, количества Ne и Мо для дифференциальной диагностики. Различия иммунных реакций в ответ на вирусную или бактериальную инфекцию обуславливают отличия ССЛ при ВМ и БГМ и могут быть рассмотрены в качестве дифференциально-диагностических критериев менингита.

В доступной литературе имеются единичные исследования, использующие фенотипирование иммунных клеток ЦСЖ и крови в клинической лабораторной диагностике для оценки степени тяжести, дифференциальной диагностики нейроинфекций, в том числе менингитов. Так, цитоз и количество CD19<sup>+</sup> В-клеток в ЦСЖ позволяет определять стадии трипаносомоза в полевых условиях [40]. При исследовании различных воспалительных нейропатий установлено, что значительное увеличение НКТ-клеток и CD8<sup>+</sup>Т-клеток характерно для хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, увеличение NK – для синдрома

Гийена-Барре, В-клеток и плазматических клеток – для рассеянного склероза [76]. Содержание НКТ клеток в ЦСЖ позволило с высокой точностью дифференцировать синдром Гийена-Барре и хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию [76]. В другом исследовании, увеличение CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в ЦСЖ и плазматических клеток в крови пациентов с нейросаркоидозом с высокой степенью достоверности отличало их от пациентов с рассеянным склерозом [77]. В настоящем исследовании выявлены субпопуляции лимфоцитов крови, которые могут быть использованы в качестве диагностических маркеров вирусной и бактериальной природы инфекции, если по показаниям невозможно проведение диагностической ЛП. Однако для дифференциальной диагностики менингита в остром периоде наиболее эффективно определение субпопуляций лимфоцитов в ликворе (общие Т-лимфоциты, Th и В-лимфоциты). При этом максимальной значимостью обладают В-лимфоциты в ликворе (специфичность – 100%, чувствительность – 97,7%) (табл. 19). Разработанный по результатам настоящего исследования метод, основанный на определении относительного содержания В-лимфоцитов в ликворе, позволяет практически со 100% эффективностью дифференцировать вирусный и бактериальный менингит (AUC – 1,0) в независимости от характера цитоза и возраста ребёнка. Наши результаты частично совпадают с результатами авторов из Японии, установивших повышение относительного содержания В-лимфоцитов (Me - 6,9%) у детей от 6 месяцев до 5 лет с БГМ [81]. Повышение содержания В-лимфоцитов в ЦСЖ оказалось характерно для другой бактериальной нейроинфекции – нейроборрелиоза [34,92]. Также повышенное содержание В-лимфоцитов (около 5%) обнаружено в ликворе больных рассеянным склерозом [36].

Выявленные в настоящем исследовании патогенетические особенности интраклеточного клеточного иммунного ответа легли в основу разработки метода эффективной дифференциальной диагностики менингитов у детей. Дополнительное исследование иммунограммы ликвора с определением

основных субпопуляции лимфоцитов и выделением относительного содержания В-клеток, позволяет в кратчайшие сроки в остром периоде, независимо от характера цитоза, дифференцировать вирусную или бактериальную природу заболевания, корректировать этиотропную терапию. Обнаруженная взаимосвязь субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора с тяжестью БГМ в перспективе может позволить разработку новых терапевтических подходов, направленных на снижение цитотоксической и иммуносупрессивной активности лимфоцитов, для снижения риска развития осложнений, инвалидизации и летальных исходов. Полученные результаты расширяют возможности клинической лабораторной диагностики менингитов у детей.

## ВЫВОДЫ

1. Обнаружены широкие области совпадения стандартных показателей крови и ликвора (общее количество лейкоцитов и уровень С-реактивного белка в крови, плеоцитоз ликвора) при вирусном серозном и бактериальном гнойном менингите у детей, что снижает их диагностическую эффективность и ограничивает использование в целях дифференциальной диагностики.

2. Оптимизирован метод проточной цитометрии для исследования популяций лимфоцитов ликвора для диагностики бактериальных и вирусных менингитов.

3. В ликворе детей группы сравнения выявлено доминирование Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов при незначительном количестве НК и В-лимфоцитов и установлено увеличение с возрастом относительного количества Т-лимфоцитов и Т-хелперов, снижение цитотоксических Т-лимфоцитов, НК и двойных негативных Т-лимфоцитов.

4. При вирусном серозном менингите у детей в остром периоде в крови относительно группы сравнения выявлено снижение содержания Т-хелперов и увеличение НКТ-клеток, тогда как в ликворе - увеличение содержания Т-хелперов, НК, двойных негативных Т-лимфоцитов, снижение цитотоксических Т-лимфоцитов и всех малых субпопуляций, что свидетельствует о преимущественном развертывании локального клеточного иммунного ответа.

5. При бактериальном гнойном менингите у детей в остром периоде в крови относительно группы сравнения выявлено снижение содержания общих Т-лимфоцитов, Т-хелперов,  $CD3^+CD8^{dim}$  и увеличение В-лимфоцитов, в ликворе - снижение общих Т-клеток, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и их субпопуляций  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$ , НКТ, двойных положительных Т-лимфоцитов при значительном увеличении количества В-клеток, НК и их субпопуляции  $CD3^-CD8^+NK$ , DN, что, в целом,

свидетельствует о разворачивании преимущественно гуморального как системного, так и интратекального иммунного ответа.

6. Более тяжелое течение бактериального гнойного менингита ассоциировано с увеличением в ликворе относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов и их субпопуляций  $CD3^+CD8^{dim}$ , DN, NKT при снижении содержания Т-хелперов и В-лимфоцитов.

7. Выявлены достоверные различия соотношений субпопуляций ликвор/кровь для вирусных и бактериальных менингитов, что свидетельствует о патогенетических особенностях интратекального и системного иммунного ответа при этих нозологических формах.

8. Для дифференциальной диагностики бактериального и вирусного менингита в остром периоде заболевания наиболее информативным является содержание В-лимфоцитов в ликворе (пороговое значение 2,7%), превышение этого показателя свидетельствует о бактериальной, а снижение – о вирусной природе менингита (специфичность – 100%, чувствительность 97,7%).

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Проведённое исследование и его результаты позволяют сформулировать ряд практических рекомендаций врачам-инфекционистам, врачам клинической лабораторной диагностики и биологам:

1. Оптимизированный метод проточной цитометрии рекомендуется использовать для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов цереброспинальной жидкости при менингитах различной этиологии.

2. При подозрении на менингит в остром периоде болезни рекомендуется назначение и проведение больным иммунофенотипирования лимфоцитов ликвора оптимизированным способом с определением в составе лимфоцитов основных субпопуляций. Метод позволяет проводить дифференциальную диагностику вирусной или бактериальной природы менингита. При содержании В-лимфоцитов более 2,7% диагностируют бактериальный менингит, при содержании В-лимфоцитов менее 2,7% - вирусный менингит (специфичность – 100%, чувствительность 97,7%, AUC-1,0).

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Для уточнения патогенеза менингита, оценки влияния дисбаланса различных субпопуляций на тяжесть течения и исход заболевания, а также поиска эффективных диагностических маркеров перспективным является углублённое исследование в крови и ликворе различных субпопуляций Т-лимфоцитов (Th и CTL типа 1, 2, 17, 9 и регуляторных Т-клеток) и В-лимфоцитов (В1- и В2-лимфоциты, В-клетки памяти).



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

B-cells – В-лимфоциты

CD - кластеров дифференцировки

CTL – цитотоксические Т-лимфоциты

IFN – интерферон

IL – интерлейкин

MHC (Major histocompatibility complex) - главный комплекс гистосовместимости

NK – натуральные/нормальные киллеры

NKT - натуральные/нормальные Т - киллеры

PRR (pattern recognition receptor) – паттерн-распознающие рецепторы

PAMP (pathogen association membrane pattern) - консервативные участки в структуре патогена, распознающиеся системой паттерн-распознающих рецепторов

Th – Т-хелперные лимфоциты

TNF - фактор некроза опухоли

TLR (Toll-like Receptors) - Толл-подобные рецепторы

БГМ – бактериальный гнойный менингит

ВМ – вирусный менингит

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ГЛБ – гематоликворный барьер

ГМ – гнойный менингит гемофильной этиологии

ЛП – люмбальная пункция

МКА (англ. CAM (Cell Adhesion Molecule)) - молекулы клеточной адгезии

ММ – менингококковый менингит

мкл - микролитр

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ПМ – пневмококковый менингит

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ССЛ – субпопуляционный состав лимфоцитов

СРБ – С-реактивный белок

ЦНС – центральная нервная система

ЦСЖ – цереброспинальная жидкость (или ликвор)

ЭВ – энтеровирус

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаркова, А.А. Пневмококковый менингит: современные аспекты диагностики и лечения / А.А. Агаркова, М.В. Покровский, Л.В. Корокина, О.А. Землянский // Клиническая фармакология и терапия. – 2019. – Т. 28, № 2. – С. 84–92.
2. Акинфиева, О.В. НКТ-клетки: характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа / О.В. Акинфиева, Л.Н. Бубнова, С.С. Бессмельцев // Онкогематология. – 2010. – Т. 5, №4. – С. 39–47.
3. Алексеева, Л.А. Значение белков и пептидов цереброспинальной жидкости в клинической лабораторной диагностике и патогенезе нейроинфекционных заболеваний у детей : дисс.... докт. биол. наук / Л.А. Алексеева. – СПб, 2003. – 225 с.
4. Алексеева, Л.А. Цитокины в цереброспинальной жидкости при менингитах у детей / Л.А. Алексеева, Е.М. Мазаева, Н.В. Скрипченко и др. // Журнал Инфектологии. – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 54–59.
5. Алексеева, Л.А. Маркеры повреждения нейронов и глии в цереброспинальной жидкости при менингитах у детей / Л.А. Алексеева, Н.В. Скрипченко, Т.В. Бессонова и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – Т. 62, № 4. – С. 204–210.
6. Балмасова, И.П. Иммунопатогенетические особенности бактериальных гнойных менингитов / И.П. Балмасова, Ю.Я. Венгеров, С.Е. Раздобарина, М.В. Нагибина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – Т. 19, № 5. – С. 17–22.
7. Балмасова, И.П. Показатели местного патогенеза и прогноза развития осложнений бактериального менингита / И.П. Балмасова, Ю.Я. Венгеров, М.М. Гультяев, М.В. Нагибина // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7, № 1(24). – С. 86–92.
8. Венгеров, Ю.Я. Актуальные аспекты патогенеза, диагностики и

лечения бактериальных гнойных менингитов / Ю.Я. Венгеров, М.В. Нагибина, Т.М. Коваленко и др. // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7, № 1(24). – С. 78–85.

9. Вильниц, А.А. Гнойные менингиты у детей: клинико-патогенетические, диагностические, прогностические и терапевтические аспекты интракраниальных осложнений : дисс.... докт. мед. наук / А.А. Вильниц. – СПб, 2019. – 322 с.

10. Горбачев, В.И. Гематоэнцефалический барьер с позиции анестезиолога-реаниматолога. Обзор литературы. Часть 1 / В.И. Горбачев, Н.В. Брагина // Вестник интенсивной терапии А.И. Салтанова. – 2020. – № 3. – С. 35–45.

11. Железникова, Г.Ф. Иммунопатогенез инфекционно-воспалительных заболеваний центральной нервной системы / Г.Ф. Железникова, Н.В. Скрипченко // Журнал инфектологии. – 2011. – Т. 3, № 2. – С. 28–32.

12. Иващенко, И.А. Клинико-морфологическая и ликворо-цитологическая характеристика бактериальных гнойных менингитов у детей раннего возраста : дисс.... канд. мед. наук / И.А. Иващенко. – СПб, 2016. – 145 с.

13. Конеев, К.И. Роль ликворологических и гемодинамических нарушений в генезе серозных менингитов у детей ; автореф. дисс.... канд. мед. наук / К.И. Конеев. – СПб, 2004. – 22 с.

14. Куприна, Н.П. Прогнозирование течения и исходов гнойных менингитов у детей / Н.П. Куприна, С.П. Кокорева, В.Б. Котлова // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2015. – Т. 16, № 6. – С. 16–19.

15. Лобзин, Ю.В. Менингиты и энцефалиты / Ю.В. Лобзин, В.В. Пилипенко, Ю.Н. Громыко. – СПб.: Фолиант, 2006. – 128 с.

16. Мазанкова, Л.Н. Эпидемиологические и клинические особенности бактериальных гнойных менингитов у детей г. Москвы / Л.Н.

Мазанкова, Г.Д. Гусева, И.А. Солдатова // Детские инфекции. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 5–11.

17. Морозова, Е.А. Исходы нейроинфекций и их предикторы // Е.А. Морозова, М.Л. Ертахова / Русский журнал детской неврологии. – 2020. – Т. 15, № 3–4. – С. 55–64.

18. Оганесян, А.Н. Эффективность методов лабораторной диагностики гнойного бактериального менингита / А.Н. Оганесян, Е.А. Воропаева, А.А. Мельникова и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 117–121.

19. Оленькова, О.М. Энтеровирусные менингиты у детей: оценка эпидемиологической значимости, особенности диагностики и клинического течения / О.М. Оленькова, О.П. Ковтун, Я.Б. Бейкин и др. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – № 1. – С. 18–22.

20. Пичугина, Л.В. Изменение фенотипа лимфоцитов при иммунодефицитных патологиях // Лабораторная Медицина. – 2008. – № 9. С. 39–44.

21. Ризопулу, А.П. Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина / А.П. Ризопулу, Ф.Ю. Гариб // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 3. – С. 581–596.

22. Скрипченко, Н.В. Особенности поражения сосудистого русла при гнойных менингитах у детей / Н.В. Скрипченко, Е.С. Егорова, А.А. Вильниц, Е.Ю. Горелик // Педиатр. – 2021. – Т. 12, № 5. – С. 27–35.

23. Скрипченко, Н.В. Ликвор и его клиническое значение при инфекционных заболеваниях нервной системы / Н.В. Скрипченко, Л.А. Алексеева, Г.Ф. Железникова // Педиатр. – 2011. – Т. 2, № 3. – С. 21–31.

24. Терещенко, С.Ю. Врожденные дисфункции паттерн-распознающих рецепторов в патогенезе инвазивной и рецидивирующей пневмококковой инфекции у детей / С.Ю. Терещенко, М.В. Смольникова // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 229–238.

25. Тотолян, А.А. Стандартизация методов иммунофенотипирования

клеток крови и костного мозга человека / А.А. Тотолян, И.А. Балдуева, Л.Н. Бубнова, А.В. и др. // Медицинская Иммунология. – 1999. – Т. 1, № 5. – С. 21–43.

26. Хайдуков, С.В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, А.А. Тотолян, В.А. Черешнев // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2–3. – С. 227–238.

27. Хайдуков, С.В. Малые субпопуляции Т-хелперов (Th наивные тимические, Th наивные центральные, Th9, Th22 и CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> дважды положительные Т-клетки // Медицинская иммунология. – 2013. – Т. 15, № 6. – С. 503–512.

28. Хайдуков, С.В. Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса / С.В. Хайдуков, Л.В. Байдун // Медицинский алфавит. – 2015. – Т. 2, № 8. – С. 44–51.

29. Ходюкова, А.Б. Лабораторное исследование цереброспинальной жидкости / А.Б. Ходюкова, Т.С. Дальнова, С.Г. Василиу-Светлицкая // Медицинские новости. – 2012. – № 1. – С. 36–40.

30. Шишов, А.С. Некоторые клинические особенности бактериальных инфекций с синдромом гнойного менингита / А.С. Шишов, У.Б. Григорьевская, А.В. Гурьянов и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова. – 2011. – Т. 111, № 4. – С. 90–95.

31. Шостакович-Корецкая, Л.Р. Энтеровирусный менингит: особенности течения и диагностики на современном этапе / Л.Р. Шостакович-Корецкая, В.Г. Слатвитский, И.В. Будаева и др. // Здоровье ребенка. – 2016. – Т. 76, № 8. – С. 78–81.

32. Ярилин, А.А. Иммунология / А.А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.

33. Abel, A.M. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization / A.M. Abel, C. Yang, M.S. Thakar, S. Malarkannan // Frontiers

in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – 1869.

34. Adam, P. Analysis of cerebrospinal fluid cell populations with monoclonal antibodies / P. Adam, O. Sobek, C.S. Scott // *Folia Microbiologica*. – 2007. – Vol. 52, №5. – P. 529–534.

35. Alonso, J.M. A model of meningococcal bacteremia after respiratory superinfection in influenza A virus-infected mice / J.M. Alonso, A. Guiyoule, M.L. Zarantonelli, F. Ramiisse, R. Pires, A. Antignac, A.L. Deghmane, M. Huerre, S. Wert, M.-K. Taha // *FEMS Microbiology Letters*. – 2003. – Vol. 222, № 1. – P. 99–106.

36. Alvermann, S. Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis: In search of biomarkers / S. Alvermann, C. Hennig, O. Stuve et. al // *JAMA Neurology*. – 2014. – Vol. 71, № 7. – P. 905–912.

37. Banovic, T. Disseminated varicella infection caused by varicella vaccine strain in a child with low invariant natural killer T cells and diminished CD1d expression / T. Banovic, M. Yanilla, R. Simmons et. al. // *Journal of Infectious Diseases*. – 2011. – Vol. 204, № 12. – P. 1893–1901.

38. Bao, Y. Identification of IFN- $\gamma$ -producing innate B cells / Y. Bao, X. Han, S. Xu et. al. // *Cell Research*. – 2014. – Vol. 24, № 2. – P. 161–176.

39. Björkström, N.K. Natural killer cells in antiviral immunity / N.K. Björkström, B. Strunz, H.G. Ljunggren // *Nature Reviews Immunology*. – 2022. – Vol. 22, № 2. – P. 112–123.

40. Bouteille, B. Cerebrospinal fluid B lymphocyte identification for diagnosis and follow-up in human African trypanosomiasis in the field / B. Bouteille, G. Mpandzou, R. Cespuglio et. al. // *Tropical Medicine and International Health*. – 2010. – Vol. 15, № 4. – P. 454–461.

41. Butcher, E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity // *Cell*. – 1991. – Vol. 67, № 6. – P. 1033–1036.

42. Campbell, J.P. Total lymphocyte CD8 expression is not a reliable marker of cytotoxic T-cell populations in human peripheral blood following an acute bout of high-intensity exercise / J.P. Campbell, K. Guy, C. Cosgrove et. al. //

Brain, Behavior, and Immunity. – 2008. – Vol. 22, № 3. – P. 375–380.

43. Chitnis, T. CNS inflammation and neurodegeneration / T. Chitnis, H.L. Weiner // *Journal of Clinical Investigation*. – 2017. – Vol. 127, № 10. – P. 3577–3587.

44. Cohen, M. Meningeal lymphoid structures are activated under acute and chronic spinal cord pathologies / M. Cohen, A. Giladi, C. Raposo et. al. // *Life Science Alliance*. – 2021. – Vol. 4, № 1. – e202000907.

45. Coureuil M. A journey into the brain: insight into how bacterial pathogens cross blood – brain barriers / M. Coureuil, H. Lecuyer, S. Bourdoulous, X. Nassif // *Nature Publishing Group*. – 2017. – Vol. 15. – № 3. – P. 149–159.

46. Cugurra A. Skull and vertebral bone marrow are myeloid cell reservoirs for the meninges and CNS parenchyma / A.Cugurra, T. Maluladze, J. Rustenhoven et. al. // *Science*. – 2021. – Vol. 373, № 6553. – eabf7844.

47. D'Acquisto, F. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>(double negative) T cells: Saviours or villains of the immune response? / F. D'Acquisto, T. Crompton // *Biochemical Pharmacology*. – 2011. – Vol. 82, № 4. – P. 333–340.

48. Dando, S.J. Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion / S.J. Dando, A. Mackay-Sim, R. Norton et. al. // *Clinical microbiology reviews*. – 2014. – Vol. 27, № 4. – P. 691-726.

49. Das, G. An important regulatory role for CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha\alpha$  T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease / G. Das, M.M. Augustine, J. Das et. al. // *PNAS*. – 2003. – Vol. 100, № 9. – P. 5324–5329.

50. Dias, M.C. Structure and junctional complexes of endothelial, epithelial and glial brain barriers / M.C. Dias, J.A. Mapunda, M. Vladymyrov, B. Engelhardt // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 21. – 5372.

51. Ding, Y. Reference values for peripheral blood lymphocyte subsets of healthy children in China / Y. Ding, L. Zhou, Y. Xia et. al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2018. – Vol. 142, № 3. – P. 970-973.e8.



52. DiSabato, D.J. Neuroinflammation: the devil is in the details / D.J. DiSabato, N. Quan, J.P. Godbout // *Journal of Neurochemistry*. – 2016. – Vol. 139, №S2. – P. 136–153.
53. Doran, K.S. Host–pathogen interactions in bacterial meningitis / K.S. Doran, M. Fulde, N. Gratz et. al. // *Acta Neuropathologica*. – 2016. – Vol. 131, № 2. – P. 185–209.
54. Dux, R.A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid / R.A. Dux, A. Kindler-Rohrborn, M. Annas et. al. // *Journal of the Neurological Sciences*. – 1994. – Vol. 121, № 1. – P. 74–78.
55. Eller, M.A. Expansion of inefficient HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells during acute infection / M.A. Eller, N. Goonetilleke, B. Tassaneetrithep et. al. // *Journal of Virology*. – 2016. – Vol. 90, № 8. – P. 4005–4016.
56. Engelhardt, B. The movers and shapers in immune privilege of the CNS / B. Engelhardt, P. Vajkoczy, R.O. Weller // *Nature Immunology*. – 2017. – Vol. 18, № 2. – P. 123–131.
57. Evans, F.L. Protective and Regenerative Roles of T Cells in Central Nervous System Disorders / F.L. Evans, M. Dittmer, A.G. de la Fuente, D.C. Fitzgerald // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – 2171.
58. Feng, M. Mechanism for the lethal effect of enterovirus A71 intracerebral injection in neonatal mice / M. Feng, Y. Liao, Y. Gao et. al. // *Laboratory Investigation*. – 2020. – Vol. 100, № 4. – P. 596–605.
59. Fernandez, C.S. NKT cell depletion in humans during early HIV infection / C.S. Fernandez, A.D. Kelleher, R. Finlayson et. al. // *Immunology and Cell Biology*. – 2014. – Vol. 92, № 7. – P. 578–590.
60. Filiano, A.J. How and why do T cells and their derived cytokines affect the injured and healthy brain? / A.J. Filiano, S.P. Gadani, J. Kipnis // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2017. – Vol. 18, № 6. – P. 375–384.
61. Fitzpatrick, Z. Gut-educated IgA plasma cells defend the meningeal venous sinuses / Z. Fitzpatrick, G. Frazer, A. Ferro et.al. // *Nature*. – 2020. – Vol. 587, № 7834. – P. 472–476.

62. Fosse, J.H. Endothelial cells in emerging viral infections / J.H. Fosse, G. Haraldsen, K. Falk, R. Edelmann // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2021. – Vol. 8. – 619690.
63. Frahm, M.A. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-cells represent a significant portion of the anti-HIV T-cell response to acute HIV infection / M.A. Frahm, R.A. Picking, J.D. Kuruc et. al. // *J Immunol*. – 2012. – Vol. 188, № 9. – P. 3831–3840.
64. Fu, R. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases / R. Fu, Q. Shen, P. Xu, Y. Tang // *Mol. Neurobiol*. – 2014. – Vol. 49, № 3. – P. 1422–1434.
65. Garcia-Prat, M. Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population / M. Garcia-Prat, D. Alvarez-Sierra, A. Aguilo-Cucurull et. al. // *Cytometry Part B Clinical Cytometry*. – 2019. – Vol. 96, № 3. – P. 223–233.
66. Giancchetti, E. NK cells in autoimmune diseases: Linking innate and adaptive immune responses / E. Giancchetti, D. Vittorio, A. Fierabracci // *Autoimmunity Reviews*. – 2018. – Vol. 17, № 2. – P. 142–154.
67. Ghersi-Egea, J.-F. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood - cerebrospinal fluid barrier in health and disease / J.-F. Ghersi-Egea, N. Strazielle, M. Catala et. al. // *Acta Neuropathologica*. – 2018. – Vol. 3, № 135. – P. 337–361.
68. Goddery, E.N. Microglia and perivascular macrophages act as antigen presenting cells to promote CD8 T cell infiltration of the brain / E.N. Goddery, C.E. Fain, C.G. Lipovsky et. al. // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – 726421.
69. Graaf, M.T.de. Central memory CD4<sup>+</sup> T cells dominate the normal cerebrospinal fluid / M.T.de. Graaf, P.A.E. Sillevius Smitt, R.L. Luiwieler et. al. // *Cytometry Part B Clinical Cytometry*. – 2011. – Vol. 80, № 1. – P. 43–50.
70. Grygorczuk, S. The lymphocyte populations and their migration into the central nervous system in tick-borne encephalitis / S. Grygorczuk, J. Osada, K. Toczyłowski et. al. // *Ticks and Tick-borne Diseases*. – 2020. – Vol. 11, № 5. –

101467.

71. Gulati, A. PRR function of innate immune receptors in recognition of bacteria or bacterial ligands / A. Gulati, D. Kaur, G.V.R. Krishna Prasad, A. Mukhopadhaya // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2018. – Vol. 1112. – P. 255–280.

72. Han, S. Comprehensive immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in patients with neuroimmunological diseases / S. Han, Y.C. Lin, T. Wu et. al. // *The Journal of Immunology*. – 2014. – Vol. 192, № 6. – P. 2551–2563.

73. Hannel, I. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations / I. Hannel, F. Erkeller-Yuksel, P. Lydyard et. al. // *Immunology Today*. – 1992. – Vol. 13, № 6. – P. 215–218.

74. Häusler, M. Flow cytometric cerebrospinal fluid analysis in children / M. Häusler, B. Sellhaus, K. Schweizer et. al. // *Pathology Research and Practice*. – 2003. – Vol. 199, № 10. – P. 667–675.

75. Hegde, S. NKT cells direct monocytes into a DC differentiation pathway / S. Hegde, X. Chen, J.M. Keaton et. al. // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2007. – Vol. 81, № 5. – P. 1224–1235.

76. Heming, M. Immune cell profiling of the cerebrospinal fluid provides pathogenetic insights into inflammatory neuropathies / M. Heming, A. Schulte-Mecklenbeck, T. Brix et. al. // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – 515.

77. Heming, M. Leukocyte profiles in blood and CSF distinguish neurosarcoidosis from multiple sclerosis / M. Heming, L. Lohmann, A. Schulte-Mecklenbeck et. al. // *Journal of Neuroimmunology*. – 2020. – Vol. 341. – 577171.

78. Herich, S. Human CCR5<sup>high</sup> effector memory cells perform CNS parenchymal immune surveillance via GZMK-mediated transendothelial diapedesis / S. Herich, T. Schneider-Hohendorf, A. Rohlmann et. al. // *Brain*. – 2019. – Vol. 142, № 11. – P. 3411–3427.

79. Herz, J. In vivo imaging of lymphocytes in the CNS reveals different behaviour of naïve T cells in health and autoimmunity / J. Herz, M. Paterka, R.A. Niesner et. al. // *Journal of Neuroinflammation*. – 2011. – Vol. 8. – 131.

80. Hickey, W.F. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles / W.F. Hickey // *Semin Immunol.* – 1999. – Vol. 11, № 2. – P. 125–137.
81. Ichiyama, T. Mononuclear cell subpopulations in CSF and blood of children with bacterial meningitis / T. Ichiyama, M. Kajimoto, T. Matsushige et.al. // *Journal of Infection.* – 2009. – Vol. 58, № 1. – P. 28–31.
82. Jack, C.S. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes / C.S. Jack, N. Arbour, J. Manusow et.al. // *Journal of immunology.* – 2005. – Vol. 175, № 7. – P. 4320–4330.
83. Jaijakul, S. The clinical significance of neutrophilic pleocytosis in cerebrospinal fluid in patients with viral central nervous system infections / S. Jaijakul, L. Salazar, S.H. Wootton et. al. // *International Journal of Infectious Diseases.* – 2017. – Vol. 59. – P. 77–81.
84. Jin, Y. Innate immunity evasion by enteroviruses linked to epidemic hand-foot-mouth disease / Y. Jin, R. Zang, W. Wu, G. Duan // *Frontiers in Microbiology.* – 2018. – Vol. 9. – 2422.
85. Jochems, S.P. Innate and adaptive nasal mucosal immune responses following experimental human pneumococcal colonization / S.P. Jochems, K. de Ruiter, C. Solorzano et. al. // *Journal of Clinical Investigation.* – 2019. – Vol. 129, № 10. – P. 4523–4538.
86. Kim, H. Blood procalcitonin level as a diagnostic marker of pediatric bacterial meningitis: A systematic review and meta-analysis / H. Kim, Y.H.Roh, S.H. Yoon // *Diagnostics.* – 2021. – Vol. 11, № 5. – 846.
87. Kitchen, S.G. CD4 on CD8<sup>+</sup> T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection / S.G. Kitchen, N.R. Jones, S. LaForge et. al. // *PNAS.* – 2004. – Vol. 101, № 23. – P. 8727–8732.
88. Kiyono, H. Nalt-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity / H. Kiyono, S. Fukuyama // *Nature Reviews Immunology.* – 2004. – Vol. 4, № 9. – P. 699–710.
89. Kleine, T.O. Cellular immune surveillance of central nervous system

bypasses blood – brain barrier and blood – cerebrospinal – fluid barrier: revealed with the new Marburg cerebrospinal – fluid Model in healthy humans / T.O. Kleine // *Cytometry Part A.* – 2015. – Vol. 87, № 3. – P. 227–243.

90. Kleine, T.O. Immune surveillance of the human central nervous system (CNS): Different migration pathways of immune cells through the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in healthy persons / T.O. Kleine, L. Benes // *Cytometry Part A.* – 2006. – Vol. 69, № 3. – P. 147–151.

91. Konsman, J.P. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology / J.P. Konsman, B. Drukarch, A.M. Van Dam // *Clinical Science.* – 2007. – Vol. 112, № 1. – P. 1–25.

92. Kowarik, M.C. Immune cell subtyping in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases / M.C. Kowarik, V. Grummel, S. Wemlinger et. al. // *Journal of Neurology.* – 2014. – Vol. 261, № 1. – P. 130–143.

93. Kumar, V. Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease / V. Kumar, T.L. Delovitch // *Immunology.* – 2014. – Vol. 142, № 3. – P. 321–336.

94. Lehnardt, S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury / S. Lehnardt // *Glia.* – 2010. – Vol. 58, № 3. – P. 253–263.

95. Lewis, L.A. Complement interactions with the pathogenic *Neisseriae*: clinical features, deficiency states, and evasion mechanisms / L.A. Lewis, S. Ram // *FEBS Letters.* – 2020. – Vol. 594, № 16. – P. 2670–2694.

96. Li, H. Evaluation of cerebrospinal fluid and blood parameters finding in early diagnosis and drug therapy of suspected bacterial meningitis in neonates / H. Li, R. Xiao, R. Javed et.al. // *Journal of Research in Medical Sciences.* – 2020. – Vol. 25, № 1. – P. 77.

97. Li, Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity / Y. Li, W. Wang, F. Yang et. al. // *Cell Communication and Signaling.* – 2019. – Vol. 17, № 1. – P. 147.

98. Liao, S. Lymphatic system: an active pathway for immune protection /

S. Liao, P.Y. Weid // *Seminars in cell and development biology*. – 2015. – Vol. 38. – P. 83–89.

99. Liberto, G.Di. Neurons under T cell attack coordinate phagocyte-mediated synaptic stripping / G.Di. Liberto, S. Pantelyushin, M. Kreutzfeldt et. al. // *Cell*. – 2018. – Vol. 175, № 2. – P. 458-471.e19.

100. Lin, H. Analysis of the effect of different NKT cell subpopulations on the activation of CD4 and CD8 T cells, NK cells, and B cells / H. Lin, M. Neida, V. Rozenkov, A.J. Nicol // *Experimental Hematology*. – 2006. – Vol. 34, № 3. – P. 289–295.

101. Lin, Y.-W. Enterovirus 71 infection of human dendritic cells / Y.W. Lin, S.-W. Wang, Y.-Y. Tung, S.-H. Chen // *Experimental Biology and Medicine*. – 2009. – Vol. 234, № 10. – P. 1166–1173.

102. Liu, K. Dendritic Cells / K. Liu // *Encyclopedia of Cell Biology*. – 2016. – Vol. 3. – P. 741–749.

103. Liu, Y.C. Macrophage polarization in inflammatory diseases / Y.C. Liu, X.B. Zou, Y.F. Chai, Y.M. Yao // *International Journal of Biological Sciences*. – 2014. – Vol. 10, № 5. – P. 520–529.

104. Lucas, S.M. The role of inflammation in CNS injury and disease / S.M. Lucas, N.J. Rothwell, R.M. Gibson // *British Journal of Pharmacology*. – 2006. – Vol. 147, № SUPPL. 1. – P. S231–S240.

105. Lucht, F. Evidence for T $\square$ cell involvement during the acute phase of echovirus meningitis / F. Lucht, G. Cordier, B. Pozzetto et. al. // *Journal of Medical Virology*. – 1992. – Vol. 38, № 2. – P. 92–96.

106. Mai, J. An evolving new paradigm: Endothelial cells - conditional innate immune cells / J. Mai, A. Virtue, J. Shen et. al. // *Journal of Hematology and Oncology*. – 2013. – Vol. 6, № 1. – P. 61.

107. Mariani, M.M. Microglia in infectious diseases of the central nervous system / M.M. Mariani, T. Kielian // *Journal of neuroimmune pharmacology*. – 2009. – Vol. 4, № 4. – P. 448–461.

108. Marrero, I. Type II NKT cells in inflammation, autoimmunity,

microbial immunity, and cancer / I. Marrero, R. Ware, V. Kumar // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – 316.

109. Matsubara, T. Mononuclear cells and cytokines in the cerebrospinal fluid of echovirus 30 meningitis patients / T. Matsubara, M. Matsuoka, K. Katayama et. al. // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* – 2000. – Vol. 3, № 5. – P. 471–474.

110. Maxeiner, H. Flow cytometric analysis of T cell subsets in paired samples of cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with neurological and psychiatric disorders / H. Maxeiner, M.T. Rojewski, A. Schmitt et. al. // *Brain Behavior and Immunity.* – 2009. – Vol. 23, № 1. – P. 134–142.

111. Melzer, N. CD8<sup>+</sup> T cells and neuronal damage: Direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability / N. Melzer, S.G. Meuth, H. Wiendl // *FASEB Journal.* – 2009. – Vol. 23, № 11. – P. 3659–3673.

112. Miner, J.J. Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood-brain barrier / J.J. Miner, M.S. Diamond // *Current Opinion in Immunology.* – 2016. – Vol. 38. – P. 18–23.

113. Negi, N. CNS: not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ / N. Negi, B.K. Das // *International Reviews of Immunology.* – 2018. – Vol. 37, № 1. – P. 57–68.

114. Negrini, B. Cerebrospinal fluid findings in aseptic versus bacterial meningitis / B. Negrini, K.J. Kelleher, E.R. Wald // *Pediatrics.* – 2000. – Vol. 105,, № 2. – P. 316–319.

115. Ní Chasaide, C. The role of the immune system in driving neuroinflammation / C. Ní Chasaide, M.A. Lynch // *Brain and Neuroscience Advances.* - 2020. – Vol. 4. – 2398212819901082.

116. Nishimura, Y. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71 / Y. Nishimura, M. Shimojima, Y. Tano et. al. // *Nature Medicine.* – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 794–798.

117. Nothelfer, K. Pathogen manipulation of B cells: the best defence is a good offence / K. Nothelfer, P.J. Sansonetti, A. Phalipon // *Nature Reviews*

Microbiology. – 2015. – Vol. 13, № 3. – P. 173–184.

118. Nourshargh, S. Leukocyte migration into inflamed tissues / S. Nourshargh, R. Alon // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41, № 5. – P. 694–707.

119. Otto, F. Role and relevance of cerebrospinal fluid cells in diagnostics and research: state-of-the-art and underutilized opportunities / F. Otto, C. Harrer, G. Pilz et. al. // *Diagnostics*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – 79.

120. Overgaard, N.H. CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> double-positive T cells: more than just a developmental stage? / N.H. Overgaard, J.W. Jung, R.J. Steptoe, J.W. Wells // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2015. – Vol. 97, № 1. – P. 31–38.

121. Pahar, B. Intestinal double-positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines / B. Pahar, A.A. Lackner, R.S. Veazey // *European Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 36, № 3. – P. 583–592.

122. Pár, G. Decrease in CD3-negative-CD8dim<sup>+</sup> and Vδ2/Vγ9 TcR<sup>+</sup> peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection / G. Pár, D. Rukavina, E.R. Podack et. al. // *Journal of Hepatology*. – 2002. – Vol. 37, № 4. – P. 514–522.

123. Prabhu, S.B. Comparison of human neonatal and adult blood leukocyte subset composition phenotypes / S.B. Prabhu, D.K. Rathore, D. Nair et. al. // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11, № 9. – e0162242.

124. Ratajczak, W. Immunological memory cells / W. Ratajczak, P. Niedzwiedzka-Rystwej, B. Tokarz-Deptula, W. Deptula // *Central European Journal of Immunology*. – 2018. – Vol. 43, № 2. – P. 194–203.

125. Ricklin, D. Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense / D. Ricklin, E.S. Reis, D.C. Mastellos et. al. // *Immunological Reviews*. – 2016. – Vol. 274, № 1. – P. 33–58.

126. Rölle, A. Memory of Infections: An Emerging Role for Natural Killer Cells / A. Rölle, J. Pollmann, A. Cerwenka // *PLoS Pathogens*. – 2013. – Vol. 9, № 9. – e1003548.



127. Rutella, S. Flow cytometric detection of perforin in normal human lymphocyte subpopulations defined by expression of activation/differentiation antigens / S. Rutella, C. Rumi, M.B. Lucia et. al. // *Immunology Letters*. – 1998. – Vol. 60, № 1. – P. 51–55.
128. Růžek, D. CD8<sup>+</sup> T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis / D. Růžek, J. Salat, M. Palus et. al. // *Virology*. – 2009. – Vol. 384, № 1. – P. 1–6.
129. Sakatoku, H. 2',5'-oligoadenylate synthetase activity and T cell subset in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of aseptic meningitis / H. Sakatoku, M. Inoue, M. Kojima et. al. // *Acta Paediatrica Japonica*. – 1997. – Vol. 39, № 1. – P. 48–53.
130. Satoh, T. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins / T. Satoh, S. Akira // *Microbiology Spectrum*. – 2016. – Vol. 4, № 6. – MCHD-0040-2016.
131. Schönrich, G. CD1-restricted T cells during persistent virus infections: “Sympathy for the devil” / G. Schönrich, M.J. Raftery // *Front Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – 545.
132. Shi F.-D. Nature killer cells in the central nervous system / F.-D. Shi, M.R. Ransohoff // *Natural Killer Cells. Basic Science and Clinical Application*. Academic press. – 2010. – P. 373–383.
133. Silva, M.T. Classical labeling of bacterial pathogens according to their lifestyle in the host: Inconsistencies and alternatives / M.T. Silva // *Frontiers in Microbiology*. – 2012. – Vol. 3. – 71.
134. Singh, A.K. Type II NKT Cells: An Elusive Population with Immunoregulatory Properties / A.K. Singh, P. Tripathi, S.L. Cardell // *Front Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – 1969.
135. Smith, N. Distinct systemic and mucosal immune responses during acute SARS-CoV-2 infection / N. Smith, P. Goncalves, B. Charbit et. al. // *Nature Immunology*. – 2021. – Vol. 22, № 11. – P. 1428–1439.
136. Solár, P. Choroid plexus and the blood-cerebrospinal fluid barrier in

disease / P. Solár, A. Zamani, L. Kubickova et. al. // *Fluids and Barriers of the CNS*. – 2020. – Vol. 17, № 1. – 35.

137. Souza-Fonseca-Guimaraes, F. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? / F. Souza-Fonseca-Guimaraes, M. Adib-Conquy, J.M. Cavillon // *Molecular medicine*. – 2012. – Vol. 18, № 1. – P. 270–285.

138. Steinmann, U. Transmigration of polymorphnuclear neutrophils and monocytes through the human blood-cerebrospinal fluid barrier after bacterial infection in vitro / U. Steinmann, J. Borkowski, H. Wolburg et. al. // *Journal of neuroinflammation*. – 2013. – Vol. 10. – 31.

139. Suh, H. Toll-like receptors in CNS viral infections / H. Suh, C.F. Brosnan, S.C. Lee // *Current topics in microbiology and immunology*. – 2009. – Vol. 336. – P. 63–81.

140. Sulik, A. Increased levels of cytokines in cerebrospinal fluid of children with aseptic meningitis caused by mumps virus and echovirus 30 / A. Sulik, A. Kroten, M. Wojtkowska, E. Oldak // *Scandinavian journal of immunology*. – 2013. – Vol. 79, № 1. – P. 68–72.

141. Svenningsson, A. Adhesion molecule expression on cerebrospinal fluid T lymphocytes: evidence for common recruitment mechanisms in multiple sclerosis, aseptic meningitis, and normal controls / A. Svenningsson, G.K. Hansson, O. Andersen et. al. // *Annals of Neurology*. – 1993. – Vol. 34, № 2. – P. 155–161.

142. Svenningsson, A. Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid / A. Svenningsson, O. Andersen, M. Edsbacke, S. Stemme // *Journal of Neuroimmunology*. – 1995. – Vol. 63, № 1. – P. 39–46.

143. Tabata, N. T cell subsets in peripheral blood and cerebrospinal fluid from children with aseptic meningitis / N. Tabata, K. Oitani, K. Morita et. al. // *Acta Paediatrica Japonica*. – 1994. – Vol. 36, № 6. – P. 632–636.

144. Takaki, H. Mucosal immune response in nasal-associated lymphoid tissue upon intranasal administration by adjuvants / H. Takaki, S. Ichimiya, M.

Matsumoto, T. Seya // *Journal of Innate Immunity*. – 2018. – Vol. 10, № 5–6. – P. 515–521.

145. Takeshita, Y. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models / Y. Takeshita, M.R. Ransohoff // *Immunological reviews*. – 2013. – Vol. 248, № 1. – P. 228–239.

146. Thorsdottir, S. The role of microglia in bacterial meningitis: Inflammatory response, experimental models and new neuroprotective therapeutic strategies / S. Thorsdottir, B. Henriques-Normark, F. Iovino // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – 576.

147. Torina, A. The Janus Face of NKT Cell Function in Autoimmunity and Infectious Diseases / A. Torina, G. Guggino, M.P.L. Manna, G. Sireci // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 14, № 2. – 440.

148. Tosato, F. Lymphocytes subsets reference values in childhood / F. Tosato, G. Buccioli, G. Pantano et. al. // *Cytometry Part A*. – 2015. – Vol. 87, № 1. – P. 81–85.

149. Trautmann, A. Human CD8 T cells of the peripheral blood contain a low CD8 expressing cytotoxic/effector subpopulation / A. Trautmann, B. Ruckert, P. Schmid-Grendelmeier et. al. // *Immunology*. – 2003. – Vol. 108, № 3. – P. 305–312.

150. Troendle, M. A systematic review of cases of meningitis in the absence of cerebrospinal fluid pleocytosis on lumbar puncture / M. Troendle, A. Pettigrew // *BMC Infectious Diseases*. – 2019. – Vol. 19, № 1. – 692.

151. Tsunoda, I. Regulatory Role of CD1d in Neurotropic Virus Infection / I. Tsunoda, T. Tanaka, R.S. Fujinami // *Journal of Virology*. – 2008. – Vol. 82, № 20. – P. 10279–10289.

152. Tupin, E. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms / E. Tupin, Y. Kinjo, M. Kronenberg // *Nature Reviews*. – 2007. – Vol. 5, № 6. – P. 405–417.

153. Uchihara, T. CSF lymphocyte subsets in aseptic meningitis: dual labelling analysis with flow cytometry / T. Uchihara, M. Ikeda, H. Takahashi

et. al. // *Acta Neurologica Scandinavica*. – 1990. – Vol. 81, № 5. – P. 468–470.

154. Umemoto, S. Mucosal immune responses associated with NKT cell activation and dendritic cell expansion by nasal administration of  $\alpha$ -galactosylceramide in the nasopharynx / S. Umemoto, S. Kodama, T. Hirano et. al. // *Otolaryngology*. – 2015. – Vol. 5, № 6. – 1000216.

155. Vos, Q. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms / Q. Vos, A. Lees, Z.Q. Wu et. al. // *Immunological Reviews*. – 2000. – Vol. 176. – P. 154–170.

156. Vrethem, M. CD4 and CD8 lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with multiple sclerosis, meningitis and normal controls / M. Vrethem, C. Dahle, C. Ekerfelt et. al. // *Acta neurologica scandinavica*. – 1998. – Vol. 97, № 4. – P. 215–220.

157. Wang, S. Pathogenic triad in bacterial meningitis : pathogen invasion, NF- $\kappa$ B activation, and leukocyte transmigration that occur at the blood-brain barrier / S. Wang, L. Peng, Z. Gai et. al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. - 148.

158. Wang, T. Enterovirus 71 protease 2Apro and 3Cpro differentially inhibit the cellular endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway via distinct mechanisms, and enterovirus 71 hijacks ERAD component p97 to promote its replication / T. Wang, B. Wang, H. Huang et. al. // *PLoS Pathogens*. – 2017. – Vol. 13, № 10. – e1006674.

159. Waschbisch, A. Analysis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive T cells in blood, cerebrospinal fluid and multiple sclerosis lesions / A. Waschbisch, L. Sammet, S. Schroder et. al. // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2014. – Vol. 177, № 2. – P. 404–411.

160. Wiatr, M. Distinct migratory pattern of naive and effector T cells through the blood-CSF barrier following Echovirus 30 infection / M. Wiatr, C. Stump-Guthier, D. Iatorre et. al. // *Journal of Neuroinflammation*. – 2019. – Vol. 16, № 1. – 232.

161. Wilson, E.H. Science in medicine trafficking of immune cells in the central nervous system / E.H. Wilson, W. Weninger, C.A. Hunter // *The journal of clinical investigation*. – 2010. – Vol. 120, № 5. – P. 1368–1379.
162. Winkley, K. Immune cell residency in the nasal mucosa may partially explain respiratory disease severity across the age range / K. Winkley, D. Banerjee, T. Bradley et. al. // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – 15927.
163. Wong, D. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1 / D. Wong, R. Prameya, K. Dorovini-Zis // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. – 1999. – Vol. 58, № 2. – P. 138–152.
164. Wong, H.R. Genetics and genomics in pediatric septic shock / H.R. Wong // *Critical Care Medicine*. – 2012. – Vol. 40, № 5. – P. 1618–1626.
165. Wu, Z. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer / Z. Wu, Y. Zheng, J. Sheng et. al. // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – 816005.
166. Yamayoshi, S. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71 / S. Yamayoshi, Y. Yamashita, J. Li et. al. // *Nature medicine*. – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 798–802.
167. Yoshida, T. C reactive protein impairs adaptive immunity in immune cells of patients with melanoma / T. Yoshida, J. Ichikawa, I. Giuroiu et. al. // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2020. – Vol. 8, № 1. – e000234.
168. Yunna, C. Macrophage M1/M2 polarization / C. Yunna, H. Mengru, W. Lei, C. Weidong // *European Journal of Pharmacology*. – 2020. – Vol. 877. – 173090.
169. Zajonc, D.M., Girardi E. Recognition of microbial glycolipids by natural killer T cells / D.M. Zajonc, E. Girardi // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – 400.
170. Zeman, D. Analysis of cerebrospinal fluid cells by flow cytometry: Comparison to conventional cytology / D. Zeman, K. Revendova, R. Bunganic et.

al. // Biomedical Papers. – 2022. – Vol. 167, № 2. – P. 121–130.

171. Zhang, L. C-Reactive protein directly suppresses Th1 cell differentiation and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis / L. Zhang, S.H. Liu, T.T. Wright et. al. // The Journal of Immunology. – 2015. – Vol. 194, № 11. – P. 5243–5252.

172. Zloza, A., Al-Harhi L. Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration / A. Zloza, L. Al-Harhi // Journal of Leukocyte Biology. – 2006. – Vol. 79, № 1. – P. 4–6.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А.

Таблица 1 - Возрастные особенности субпопуляционного состава лимфоцитов крови детей с вирусным серозным менингитом в динамике заболевания.

| Субпопуляции лимфоцитов              | Содержание. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] |                           |                       |                           |                          |                          |
|--------------------------------------|---|---------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                      | 1 группа (2-6 лет)                                  |                           | 2 группа (6-12 лет)   |                           | 3 группа (12-18 лет)     |                          |
|                                      | ОП<br>N=14  | ПР<br>N=11                | ОП<br>N=29            | ПР<br>N=18                | ОП<br>N=19               | ПР<br>N=15               |
| T-cells                              | 68,8<br>[60,4 – 74,4]                               | 71,0<br>[64,6 – 73,3]     | 70,0<br>[59,6 – 74,7] | 72,5<br>[68,6 – 76,2]     | 67,7<br>[59,2 – 73,3]    | 70,0<br>[64,8 – 73,8]    |
| Th                                   | 35,1<br>[26,2 – 42,4]                               | 36,3<br>[33,8 – 43,3]     | 36,1<br>[32,7 – 40,6] | 41,0 ***<br>[35,6 – 44,1] | 35,3<br>[32,0 – 42,3]    | 38,3<br>[31,6 – 44,4]    |
| CTL                                  | 23,1<br>[19,7 – 28,8]                               | 23,4<br>[20,7 – 28,9]     | 24,6<br>[21,4 – 27,7] | 26,7<br>[21,2 – 28,1]     | 24,4<br>[21,1 – 28,0]    | 25,3<br>[21,6 – 28,8]    |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>   | 20,6<br>[15,7 – 25,8]                               | 20,0<br>[15,4 – 25,9]     | 21,4<br>[19,1 – 25,4] | 23,0<br>[18,7 – 24,6]     | 21,7<br>[17,4 – 23,3]    | 21,2<br>[18,2 – 24,8]    |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>  | 3,3<br>[3,0 – 4,8]                                  | 4,8<br>[3,0 – 5,1]        | 3,8<br>[2,9 – 4,8]    | 3,3<br>[2,4 – 5,0]        | 4,6<br>[3,1 – 5,7]       | 3,9<br>[3,6 – 5,1]       |
| DN                                   | 5,8<br>[4,3 – 7,9]                                  | 6,7<br>[4,1 – 8,2]        | 5,0<br>[3,3 – 6,6]    | 5,9<br>[3,6 – 6,5]        | 3,7<br>[2,9 – 5,5]       | 3,7 *, **<br>[3,2 – 4,5] |
| DP                                   | 0,6<br>[0,4 – 0,8]                                  | 0,7<br>[0,6 – 1,2]        | 0,6<br>[0,5 – 0,9]    | 0,6<br>[0,4 – 0,8]        | 0,8<br>[0,5 – 1,0]       | 0,7<br>[0,4 – 0,9]       |
| NKT                                  | 1,5<br>[0,9 – 2,8]                                  | 1,5<br>[0,8 – 1,9]        | 2,1 *<br>[1,7 – 3,1]  | 2,1<br>[1,4 – 3,2]        | 3,6 *, **<br>[2,2 – 4,4] | 3,2 *, **<br>[2,2 – 4,3] |
| NK                                   | 7,7<br>[5,2 – 14,3]                                 | 8,9<br>[5,7 – 12,6]       | 8,3<br>[4,9 – 14,0]   | 8,7<br>[5,7 – 11,4]       | 14,1<br>[6,0 – 16,9]     | 12,0<br>[7,7 – 19,9]     |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> NK | 2,5<br>[1,6 – 4,9]                                  | 3,1<br>[2,0 – 5,1]        | 2,2<br>[1,9 – 5,1]    | 2,5<br>[1,8 – 4,9]        | 5,0 **<br>[2,4 – 7,7]    | 5,5 **<br>[3,2 – 10,2]   |
| B-cells                              | 20,4<br>[17,9 – 22,9]                               | 15,7 ***<br>[13,7 – 20,0] | 20,5<br>[16,4 – 26,2] | 17,6<br>[14,5 – 10,3]     | 17,9<br>[14,6 – 20,7]    | 15,9<br>[11,9 – 19,1]    |
| Th/CTL                               | 1,4<br>[1,1 – 2,0]                                  | 1,6<br>[1,2 – 2,1]        | 1,5<br>[1,2 – 1,9]    | 1,6<br>[1,2 – 2,0]        | 1,5<br>[1,2 – 1,8]       | 1,5<br>[1,1 – 1,9]       |

Примечание: \* - различия между 2-й и 1 группой в разные периоды заболевания, \*\* - различия между 2-й и 3-й группой в разные периоды заболевания, \*\*\* - отличие острого периода от периода реконвалесценции. ОП – острый период, ПР – период реконвалесценции.

Таблица 2 - Возрастные особенности субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора детей с вирусным серозным менингитом в динамике заболевания.

| Субпопуляции лимфоцитов              | Содержание. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] |                           |                       |                              |                           |                              |
|--------------------------------------|---|---------------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|
|                                      | 1 группа (2-6 лет)                                  |                           | 2 группа (6-12 лет)   |                              | 3 группа (12-18 лет)      |                              |
|                                      | ОП<br>N=21  | ПР<br>N=9                 | ОП<br>N=36            | ПР<br>N=18                   | ОП<br>N=24                | ПР<br>N=14                   |
| T-cells                              | 95,3<br>[87,2 - 96,7]                               | 91,9<br>[86,3 - 95,5]     | 96,0<br>[93,9 - 96,9] | 95,5<br>[91,0 - 96,9]        | 95,8<br>[93,6 - 97,2]     | 95,0<br>[93,1 - 96,5]        |
| Th                                   | 61,8<br>[46,9 - 67,2]                               | 40,1 ***<br>[28,2 - 47,9] | 65,4<br>[58,6 - 73,5] | 54,4 *, ***<br>[47,7 - 67,3] | 70,4 ***<br>[67,1 - 73,5] | 62,3 *, ***<br>[48,7 - 70,2] |
| CTL                                  | 19,6<br>[14,5 - 26,0]                               | 27,9 ***<br>[23,9 - 39,0] | 15,9<br>[13,2 - 23,4] | 24,8 ***<br>[18,6 - 29,0]    | 16,4<br>[13,6 - 19,9]     | 24,0 ***<br>[17,2 - 28,3]    |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>   | 13,3<br>[11,5 - 22,2]                               | 21,9<br>[8,1 - 35,0]      | 13,4<br>[11,0 - 18,9] | 19,7 ***<br>[14,0 - 24,9]    | 13,6<br>[10,8 - 17,1]     | 21,0 ***<br>[15,5 - 25,7]    |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>  | 6,0<br>[3,6 - 7,8]                                  | 7,9<br>[5,5 - 20,3]       | 4,1 *<br>[3,1 - 4,8]  | 5,3 ***<br>[3,8 - 10,0]      | 3,9 *<br>[3,1 - 5,3]      | 5,5 *, ***<br>[4,5 - 6,8]    |
| DN                                   | 10,9<br>[5,6 - 17,3]                                | 13,0<br>[9,3 - 16,1]      | 7,3<br>[5,4 - 14,0]   | 7,3 *<br>[5,2 - 12,0]        | 5,6 *, **<br>[3,2 - 7,8]  | 4,9 *<br>[3,9 - 11,5]        |
| DP                                   | 1,1<br>[0,8 - 2,3]                                  | 1,9<br>[1,1 - 4,9]        | 1,2<br>[0,8 - 1,6]    | 2,1 ***<br>[1,4 - 3,8]       | 1,3<br>[0,9 - 2,1]        | 2,9***<br>[1,6 - 4,0]        |
| NKT                                  | 2,9<br>[1,8 - 11,4]                                 | 2,5<br>[1,5 - 5,5]        | 6,6<br>[3,1 - 9,6]    | 7,7 *<br>[5,0 - 15,8]        | 3,0 **<br>[1,9 - 7,3]     | 3,2 **<br>[2,2 - 4,9]        |
| NK                                   | 2,6<br>[1,6 - 5,4]                                  | 3,6<br>[1,7 - 6,8]        | 3,2<br>[1,6 - 4,5]    | 2,5<br>[1,5 - 3,9]           | 4,0<br>[1,8 - 5,6]        | 3,0<br>[1,8 - 4,8]           |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> NK | 0,6<br>[0,3 - 0,8]                                  | 1,5 ***<br>[0,6 - 1,8]    | 0,6<br>[0,3 - 1,1]    | 0,7 *<br>[0,4 - 0,9]         | 0,7<br>[0,5 - 1,0]        | 0,7 *<br>[0,4 - 1,1]         |
| B-cells                              | 1,4<br>[0,4 - 3,2]                                  | 1,2<br>[0,8 - 4,5]        | 0,4 *<br>[0,1 - 0,9]  | 0,8 ***<br>[0,4 - 3,1]       | 0,3 *<br>[0,2 - 0,5]      | 1,4 ***<br>[0,6 - 2,0]       |
| Th/CTL                               | 2,6<br>[2,0 - 4,7]                                  | 1,3 ***<br>[0,9 - 1,8]    | 4,1<br>[2,7 - 5,0]    | 2,0 *, ***<br>[1,5 - 3,0]    | 4,4 *<br>[3,5 - 5,8]      | 2,6 *, ***<br>[1,9 - 3,7]    |

Примечание: \* - различия между 2-й и -1й группой в разные периоды заболевания, \*\* - различия между 2-й и 3-й группой в разные периоды заболевания, \*\*\* - отличие острого периода от периода реконвалесценции. ОП - острый период, ПР - период реконвалесценции.



Таблица 3 - Возрастные особенности относительного содержания субпопуляций лимфоцитов крови детей при бактериальном гнойном менингите в разные периоды заболевания.

| Субпопуляции лимфоцитов              | Содержание. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] |                    |                    |                    |                      |                      |                              |                              |
|--------------------------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                      | 1 группа (3-12 мес)                                 |                    | 2 группа (1-2 лет) |                    | 3 группа (2-6 лет)   |                      | 4 группа (6-12 лет)          |                              |
|                                      | ОП (n=5)  | ПР (n=7)           | ОП (n=2)           | ПР (n=2)           | ОП (n=11)            | ПР (n=11)            | ОП (n=6)                     | ПР (n=6)                     |
| T-cells                              | 40,7 [36,7 – 60,4]                                  | 71,9 [55,7 – 78,6] | 53,0 [45,4 – 60,7] | 73,9 [62,2 – 85,6] | 48,7 [44,3 – 57,7]   | 64,9 [61,5 – 73,2]   | 61,8 [52,3 – 69,9]<br>***    | 76,3 [70,5 – 79,3]<br>***    |
| Th                                   | 25,8 [23,4 – 41,5]                                  | 47,3 [36,5 – 52,8] | 30,7 [28,7 – 32,6] | 49,0 [42,1 – 55,8] | 31,9 [25,3 – 37,9]   | 41,5 [34,8 – 43,1]   | 29,5 [25,5 – 38,8]           | 36,0 [29,9 – 41,4]           |
| CTL                                  | 13,0 [9,5 – 19,9]                                   | 20,1 [14,5 – 23,3] | 19,9 [14,7 – 25,1] | 21,9 [18,2 – 25,6] | 13,0 [11,1 – 18,1]   | 20,6 [13,8 – 24,3]   | 25,1 [19,1 – 27,9]<br>*, *** | 32,9 [28,3 – 35,7]<br>*, *** |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>   | 12,6 [8,8 – 18,3]                                   | 19,7 [13,6 – 22,5] | 19,7 [13,5 – 25,8] | 20,3 [16,5 – 24,0] | 11,7 [10,4 – 16,8]   | 19,0 [15,8 – 23,3]   | 23,2 [18,0 – 26,2]<br>*, *** | 28,9 [26,4 – 34,2]<br>*, *** |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>  | 0,7 [0,5 – 1,6]                                     | 1,7 [1,5 – 2,1]    | 1,1 [0,8 – 1,3]    | 2,8 [2,1 – 3,5]    | 1,4 [1,2 – 1,8]      | 2,3 [1,9 – 3,6]      | 2,9 [2,0 – 3,8]<br>*, ***    | 3,5 [2,5 – 4,5]<br>*, ***    |
| DN                                   | 1,2 [0,6 – 1,3]                                     | 1,7 [1,6 – 2,2]    | 1,3 [1,1 – 1,5]    | 1,6 [1,4 – 1,9]    | 2,1 [1,7 – 3,4]<br>* | 3,1 [2,6 – 4,4]<br>* | 5,6 [4,2 – 8,5]<br>*, ***    | 5,2 [4,5 – 8,1]<br>*, ***    |
| DP                                   | 0,4 [0,2 – 0,8]                                     | 0,9 [0,8 – 1,0]    | 1,1 [0,8 – 1,5]    | 1,5 [0,6 – 2,4]    | 0,4 [0,3 – 0,7]      | 0,7 [0,4 – 1,1]      | 0,7 [0,4 – 0,8]              | 0,9 [0,6 – 1,8]              |
| NKT                                  | 0,12 [0,04 – 0,14]                                  | 0,23 [0,12 – 0,34] | 0,3 [0,2 – 0,4]    | 0,5 [0,3 – 0,8]    | 0,5 [0,3 – 0,7]<br>* | 1,0 [0,4 – 2,3]<br>* | 2,4 [1,1 – 2,9]<br>*, ***    | 3,2 [1,9 – 3,8]<br>*, ***    |
| NK                                   | 0,9 [0,2 – 4,7]                                     | 2,1 [0,5 – 3,7]    | 1,4 [0,6 – 2,3]    | 1,0 [0,6 – 1,4]    | 3,1 [1,9 – 5,1]      | 3,2 [1,3 – 8,8]      | 7,6 [3,2 – 14,6]             | 5,6 [4,4 – 11,6]<br>*        |
| CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> NK | 0,6 [0,3 – 1,7]                                     | 1,0 [0,5 – 1,7]    | 0,7 [0,6 – 0,8]    | 0,8 [0,8 – 0,8]    | 1,4 [0,8 – 1,9]      | 1,7 [0,9 – 3,3]      | 3,0 [1,5 – 5,0]<br>*         | 2,9 [1,9 – 4,9]<br>*         |
| B-cells                              | 56,1 [35,0 – 59,1]                                  | 25,0 [16,7 – 36,7] | 42,9 [37,2 – 48,5] | 24,3 [12,6 – 36,0] | 47,3 [33,6 – 52,4]   | 28,4 [17,2 – 34,9]   | 27,0 [20,7 – 32,3]<br>***    | 15,9 [13,1 – 18,9]<br>***    |
| Th/CTL                               | 2,3 [1,6 – 3,0]                                     | 2,2 [1,7 – 2,9]    | 1,6 [1,3 – 1,9]    | 2,3 [2,2 – 2,3]    | 2,3 [1,7 – 2,9]      | 1,8 [1,5 – 3,6]      | 1,3 [1,0 – 1,9]<br>*, ***    | 1,0 [0,9 – 1,5]<br>*, ***    |

Примечание: 1 – острый период, 2 – Период реконвалесценции; \* - отличия от 1-й группы в разные периоды заболевания, \*\* - различия между 2-й и 3-й, 4-ой группой в разные периоды заболевания, \*\*\* - различия между 3-й и 4-й группой в разные периоды заболевания. ОП - острый период, ПР - период реконвалесценции.

Таблица 4 - Возрастные особенности относительного содержания субпопуляций лимфоцитов ликвора детей с бактериальным гнойным менингитом в динамике заболевания.

| Субпопуляции лимфоцитов              | Содержание. Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ] |                    |                    |                    |                         |                         |                                |                          |
|--------------------------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|
|                                      | 1 группа (3-12 мес.)                                |                    | 2 группа (1-2 лет) |                    | 3 группа (2-6 лет)      |                         | 4 группа (6-12 лет)            |                          |
|                                      | ОП (n=7)  | ПР (n=8)           | ОП (n=4)           | ПР (n=3)           | ОП (n=15)               | ПР (n=11)               | ОП (n=6)                       | ОП (n=6)                 |
| T-cells                              | 59,2 [50,2 – 77,1]                                  | 82,3 [77,7 – 88,8] | 76,0 [70,3 – 88,9] | 88,2 [83,7 – 91,6] | 80,1 [76,1 – 84,0]<br>* | 87,5 [84,8 – 94,3]<br>* | 88,9 [81,7 – 93,4]<br>*        | 95,3 [89,4 – 97,6]<br>*  |
| Th                                   | 30,9 [26,8 – 41,5]                                  | 37,5 [24,6 – 49,4] | 39,7 [30,4 – 45,8] | 43,3 [42,4 – 57,7] | 52,3 [48,6 – 56,7]<br>* | 52,0 [50,0 – 58,0]<br>* | 52,0 [47,9 – 72,1]<br>*, **    | 56,8 [39,8 – 60,2]<br>*  |
| CTL                                  | 16,3 [13,1 – 40,6]                                  | 22,4 [20,7 – 36,6] | 25,9 [18,5 – 48,8] | 35,8 [19,2 – 43,2] | 19,9 [12,7 – 24,5]      | 26,1 [17,6 – 28,6]      | 19,0 [13,6 – 21,1]             | 28,1 [23,2 – 33,7]       |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>   | 12,5 [10,5 – 39,2]                                  | 18,8 [15,8 – 35,8] | 21,1 [14,9 – 46,3] | 32,9 [15,2 – 41,3] | 14,5 [11,5 – 21,0]      | 24,3 [16,2 – 25,9]      | 16,2 [10,2 – 20,2]             | 25,4 [20,4 – 33,7]       |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>  | 3,3 [2,8 – 6,5]                                     | 5,4 [4,1 – 8,0]    | 6,6 [4,6 – 7,5]    | 5,8 [5,2 – 6,2]    | 4,4 [2,6 – 6,7]         | 5,3 [3,8 – 6,0]         | 5,1 [3,4 – 5,7]                | 4,0 [3,7 – 4,4]<br>**    |
| DN                                   | 8,2 [3,2 – 10,0]                                    | 9,3 [5,0 – 24,7]   | 5,9 [4,1 – 7,0]    | 5,5 [3,1 – 6,2]    | 7,6 [4,6 – 13,9]        | 8,6 [6,1 – 10,1]        | 9,6 [3,8 – 14,2]               | 7,3 [4,1 – 14,8]         |
| DP                                   | 0,8 [0,7 – 2,6]                                     | 2,0 [1,1 – 2,2]    | 2,8 [1,6 – 4,5]    | 2,8 [1,4 – 2,9]    | 1,3 [0,5 – 1,9]<br>**   | 1,7 [1,0 – 3,5]         | 2,4 [1,7 – 3,2]<br>***         | 1,8 [1,5 – 3,8]          |
| NKT                                  | 5,3 [1,0 – 5,6]                                     | 4,8 [1,6 – 8,2]    | 3,6 [1,5 – 4,8]    | 1,9 [1,4 – 2,7]    | 2,6 [1,6 – 6,3]         | 4,2 [2,4 – 6,6]         | 3,6 [3,0 – 4,8]                | 3,3 [2,3 – 7,0]          |
| NK                                   | 7,4 [3,2 – 10,2]                                    | 8,4 [5,2 – 10,5]   | 2,6 [1,8 – 5,9]    | 2,5 [2,2 – 4,4]    | 3,3 [1,6 – 8,2]         | 3,1 [1,9 – 7,1]         | 4,0 [3,1 – 5,7]                | 2,0 [1,1 – 3,8]<br>*     |
| CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> NK | 1,0 [0,4 – 3,1]                                     | 1,6 [0,9 – 2,4]    | 0,7 [0,5 – 1,2]    | 0,9 [0,8 – 0,9]    | 0,8 [0,5 – 1,3]         | 0,8 [0,6 – 2,0]         | 0,9 [0,4 – 2,3]                | 0,5 [0,3 – 1,2]<br>*     |
| B-cells                              | 20,9 [8,8 – 37,2]                                   | 5,3 [3,2 – 11,7]   | 17,5 [8,8 – 19,9]  | 8,6 [5,9 – 9,2]    | 14,0 [9,3 – 19,2]       | 3,9 [1,6 – 6,3]         | 3,7 [3,2 – 11,0]<br>*, **, *** | 1,8 [0,7 – 3,0]<br>*, ** |
| Th/CTL                               | 2,0 [0,7 – 3,1]                                     | 1,4 [1,1 – 2,2]    | 1,6 [0,7 – 2,6]    | 1,2 [1,0 – 3,0]    | 2,8 [1,8 – 4,3]         | 2,1 [1,9 – 2,4]<br>*    | 2,7 [2,3 – 6,8]                | 2,1 [1,8 – 2,2]          |

Примечание: 1 – острый период, 2 – период реконвалесценции; \* - отличие от 1-й группы в разные периоды заболевания, \*\* - различия между 2-й и 3-й, 4-ой группой в разные периоды заболевания, \*\*\* - различия между 3-й и 4-й группой в разные периоды заболевания. ОП - острый период, ПР - период реконвалесценции.